



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

**“Patogénesis y vacunas contra la enfermedad de  
Newcastle”**

**TRABAJO ACADÉMICO**

Para optar el Título de Segunda Especialidad en Clínica y  
Patología Aviar

**AUTOR**

Nelly Giovanna CRIBILLERO CHUQUIHUACCHA

**ASESOR**

Eliana ICOCHEA D'ARRIGO

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Cribillero N. Patogénesis y vacunas contra la enfermedad de Newcastle [Trabajo académico]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2019.

---

## HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código ORCID del autor	<a href="https://orcid.org/0000-0002-8136-8717">https://orcid.org/0000-0002-8136-8717</a>
DNI o pasaporte del autor	40599772
Código ORCID del asesor	<a href="https://orcid.org/0000-0001-7102-0584">https://orcid.org/0000-0001-7102-0584</a>
DNI o pasaporte del asesor	09161133
Grupo de investigación	GINAVES
Agencia financiadora	<b>PAIS</b>
	Perú
	<b>NOMBRE Y SIGLAS DE LA AGENCIA FINANCIADORA</b>
	<b>NOMBRE DEL PROGRAMA FINANCIERO:</b>
	<b>N° DE CONTRATO</b>
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	<b>LUGAR</b>
	Perú, Lima, Lima, San Borja, Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM Av. Circunvalación 2800
	<b>COORDENADAS GEOGRAFICAS</b>
	12°04'53.0"S 76°59'11.9"W -12.081375, -76.986632
Año o rangos de años en que se realizó la investigación	2018 - 2019
Disciplinas OCDE	Ciencia veterinaria <a href="http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01">http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01</a>
	Patología <a href="http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.09">http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.09</a>



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
Universidad del Perú. Decana de América  
**Facultad de Medicina Veterinaria**  
UNIDAD DE POSGRADO



**ACTA DE SUSTENTACION DE TRABAJO ACADÉMICO PARA OPTAR EL  
TÍTULO DE SEGUNDA ESPECIALIDAD PROFESIONAL EN CLÍNICA Y  
PATOLOGÍA AVIAR**

En el Auditorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 15:00 horas del día jueves 25 de julio del 2019, el Jurado Ad-Hoc designado para llevar a cabo la evaluación del trabajo académico siendo presidido por la Mg. Mercy Ramírez Velásquez y conformado por los siguientes miembros docentes: Mg. Gina Ruth Castro Sanguinetti, M.V. Esp. Mónica Cecilia Alba Chinchá, Mg. Hugo Castillo Doloriert, Mg. Eliana Icochea D'Arrigo (**Asesora**), se dio inicio a la sustentación oral y pública del Trabajo Académico intitulada:

**"PATOGÉNESIS Y VACUNAS CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE"**, presentado por la Médico Veterinaria:

**NELLY GIOVANNA CRIBILLERO CHUQUIHUACCHA**

Luego de sustentar el Trabajo Académico para obtener el Título de Segunda Especialidad Profesional en Clínica y Patología Aviar y absolvió satisfactoriamente las preguntas y observaciones del Jurado y el público asistente, obtuvo la calificación de: **MUY BUENO (17) DIECISIETE**

A continuación, el Jurado por intermedio de su Presidenta informó a la Unidad de Posgrado para que proponga el otorgamiento del Título de Segunda Especialidad Profesional en Clínica y Patología Aviar, a la M.V. Nelly Giovanna Cribillero Chuquihuacha.

Siendo las 16:30 horas del día jueves 25 de julio de 2019, se dio por concluido el acto académico y el Jurado procedió a suscribir la presente Acta.

Mg. Mercy Ramírez Velásquez (P.A.D.E)  
**Presidenta**

Mg. Gina Ruth Castro Sanguinetti (P.A.T.C)  
**Miembro**

M.V. Esp. Mónica Cecilia Alba Chinchá  
**Miembro (Externo)**

Mg. Hugo Castillo Doloriert (P.A.T.C)  
**Miembro**

Mg. Eliana Icochea D'Arrigo (P.P.D.E)  
**Miembro (asesora)**

Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)  
**Director de la Unidad de Posgrado**



## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT .....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	4
1. Historia .....	4
2. Importancia económica .....	4
2.1 Situación actual del VEN en el Perú.....	5
3. Etiología .....	6
3.1 Clasificación taxonómica.....	6
3.2 Estructura viral y composición química .....	7
3.3 Propiedades biológicas .....	9
3.4. Clasificación de Cepas.....	10
4. Replicación viral .....	13
5. Factores de virulencia.....	15
5.1 Proteína F .....	15
5.2 Proteína HN .....	16
5.3 Proteína V .....	16
5.4 Complejo de replicación (Genes NP/P/L).....	17
6. Epidemiología .....	17
6.1 Incidencia y distribución.....	18
6.2 Hospedadores Naturales .....	19
6.3 Transmisión, portadores, vectores y diseminación.....	21
7. Patogenie .....	23
7.1 Periodo de incubación .....	23
7.2 Signos clínicos en aves domésticas .....	23
7.3 Signos clínicos en aves silvestres .....	25
7.4 Lesiones macroscópicas.....	26
7.5 Histopatología .....	28
7.6 Respuesta Inmunitaria .....	28
8. Diagnóstico .....	35
8.1 Aislamiento viral .....	36

8.2 Serología .....	37
8.3 Pruebas moleculares .....	39
9. Estrategias de prevención y control.....	46
9.1 Bioseguridad .....	46
9.2 Vacunación .....	48
9.3 Métodos de vacunación .....	59
9.4 Programas de vacunación utilizados en Perú .....	59
10. VEN y su uso en medicina humana.....	60
III. DISCUSIÓN .....	62
IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	65
VI. LITERATURA CITADA.....	67

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Esquema de la estructura del virus de la enfermedad de Newcastle, donde se muestran las proteínas estructurales (Ganar, 2014).

Figura 2. Las glicoproteínas F y HN median la entrada del VEN en las células diana (Sayantan, 2012, disponible en: <https://www.pnas.org/content/109/39/E2625/1>).

Figura 3. Aves infectadas con el VEN mostrando signos de depresión, edema facial y plumas erizadas. (Laboratorio de Patología Aviar FMV-UNMSM).

Figura 4. Hemorragias difusas en mucosa de la molleja y proventrículo en un pollo de engorde infectado con VEN. (Laboratorio de Patología Aviar FMV-UNMSM).

Figura 5. Hemorragias en la mucosa de la bursa de Fabricio en un pollo de engorde infectado con VEN. (Laboratorio de Patología Aviar FMV-UNMSM).



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

### **A**

AAvV-1: Avulavirus Aviar 1 o Avian Avulavirus.

AOAV-1: Avian orthoavulavirus.

APA: Asociación peruana de avicultura.

APMV-1: Avian Paramyxovirus type.

ARNm: Ácido ribonucleico (ARN) mensajero.

### **C**

Células DF-1: línea celular continua de fibroblastos de embrión de pollo.

Células NK: natural killer cells, células asesinas naturales.

Complejo N-P: Complejo nucleocápside fosfoproteína.

Complejo P-L: Complejo de replicación fosfoproteína-polimerasa.

### **E**

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

ENVN: Enfermedad de Newcastle Velogénica Neurotrópica.

ENVV: Enfermedad de Newcastle Velogenica viscerotrópica.

### **F**

FMV-UNMSM: Facultad de Medicina Veterinaria- Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

### **G**

GFP: Green flourescent protein.

GR: Glóbulos rojos.

### **H**

HA: Hemaglutinación.

HI: Hemagglutination inhibition test.

HN: Proteína de hemaglutinina-neuraminidasa.

HVT: Herpesvirus del pavo.

## I

IBD: Infectious bursal disease.

IFN: Interferón.

IFNs: Interferones.

IFN- $\gamma$ : Interferon gamma.

IL-6: Interleucina.

IMC: Inmunidad mediada por células.

iNOS: Inducible nitric oxide synthase.

IPIC: Índice de patogenicidad intra cerebral; Índice de patogenicidad intracraneana.

IPIV: Índice de patogenicidad intravenosa.

## L

LAMP: Loop mediated isothermal amplification.

LGP2: La proteína codificada por el gen DHX58 se conoce como LGP2 (Laboratorio de Genética y Fisiología 2, Laboratory of Genetics and Physiology 2).

## M

mAb: Anticuerpos monoclonales.

mAbs: Monoclonal antibodies, anticuerpos monoclonales.

MDA5: Proteína codificada por el gen asociado con la diferenciación del melanoma.

MDT: Mean death time.

MHC: Major histocompatibility complex.

MIP-3 $\alpha$ : Chemokine macrophage inflammatory protein 3 alfa.

Mx: Myxovirus resistance gene.

## **N**

NDV: Newcastle disease virus.

NGS: Next generation sequence, secuenciación de nueva generación; next-generation sequencing.

NO: Nitric oxide.

NOD: Nucleotide-binding oligomerization domain proteins.

## **O**

OIE: Organización mundial de sanidad animal.

ONT: Oxford Nanopore Technologies.

ORF: Open reading frame, marco de lectura abierta.

## **P**

PAMP's: Pathogen-associated molecular patterns.

PHYL.MV.42: Cepa apatógena entérica.

PPMV-1: Pigeon Paramyxovirus-1.

Proteína F: Proteína de fusión.

Proteína F2: Proteína de fusión, proteína de superficie del VEN segmento F2.

Proteína L: Polimerasa.

Proteína M: Proteína de membrana.

Proteína P: Proteína fosfoproteína.

Proteína STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription, son un grupo de proteínas que actúan principalmente como transductoras de señales y activadoras de la transcripción.

PRR's: Pattern recognition receptors.

## **Q**

qPCR: quantitative polymerase chain reaction.

## R

RIG-I: Retinoic acid-inducible gene 1.

RRT-PCR: Real time reverse transcription polymerase chain reaction.

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction.

## S

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad Agraria.

SPF: Specific Pathogen Free, aves libres de patógenos específicos.

SPR: Surface plasmon resonance.

SYBR *green*: Colorante para la cuantificación de ADN de doble cadena en algunos métodos de PCR cuantitativa o para la visualización del ADN en la electroforesis con geles de agarosa.

## T

TCID<sub>50</sub>: Tissue Culture Infectious Dose 50%, cuantifica la cantidad de virus necesaria para destruir o producir cualquier otro tipo de efecto citopático en el 50% de las células o cultivos infectados.

Th1: T cell helper 1, celular ayudadora tipo 1.

TLR: Toll like receptors.

## V

VENlo: Virus de enfermedad de Newcastle lentogénico o de baja virulencia.

VENv: Virus de enfermedad de Newcastle velogénico; Virus de enfermedad de Newcastle virulento.

VG-GA: Cepa apatógena entérica Villegas-Glisson/Universidad de Georgia.

VIA: Virus de Influenza Aviar.

VLPs: Virus like particles.

VN: Virus neutralización.

## **RESUMEN**

La enfermedad de Newcastle (EN) ha sido definida por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como una infección de aves de corral con cepas virulentas del virus de la enfermedad de Newcastle (VEN). Las lesiones se observan con mayor frecuencia a nivel de sistema nervioso, gastrointestinal, respiratorio y reproductivo. El control de la EN debe incluir una bioseguridad estricta, que evita que el VEN virulento entre en contacto con las aves de corral, y adicionalmente la administración de un programa de vacunación eficaz. Las vacunas de EN, adecuadamente administradas, son producidas en base a VEN de baja virulencia o vacunas de vectores virales que expresan la proteína de fusión del VEN, las cuales son capaces de prevenir la enfermedad clínica y la mortalidad en pollos tras la infección con VEN virulento. Las vacunas vivas e inactivadas se han utilizado ampliamente desde la década de 1940. Actualmente, las vacunas recombinantes y homólogas se vienen utilizando en algunos países, y muchos otros enfoques de vacunas han sido sólo evaluados experimentalmente. En esta revisión, se describe una perspectiva histórica, breve reseña de la situación actual, las características y clasificación del virus, la fisiopatología de la enfermedad, la respuesta inmune al VEN, métodos de diagnóstico, vacunas tradicionales y experimentales para la EN y breve descripción del VEN como agente oncolítico.

Palabras clave: enfermedad de Newcastle, virus, vacunas, fisiopatología.

## **ABSTRACT**

Newcastle disease (ND) has been defined by the World Organization for Animal Health as an infection of poultry with virulent strains of Newcastle disease virus (NDV). The lesions are observed more frequently at the nervous, gastrointestinal, respiratory and reproductive systems. Control of EN must include strict biosecurity, which prevents virulent VEN from coming into contact with poultry, and additionally the administration of an effective vaccination program. EN vaccines, properly administered, are produced on the basis of low virulence VEN or viral vector vaccines that express the VEN fusion protein, which are capable of preventing clinical disease and mortality in chickens after infection with virulent VEN. Live and inactivated vaccines have been widely used since the 1940s. Currently, recombinant and homologous vaccines have been used in some countries, and many other vaccine approaches have only been experimentally evaluated. In this review, we describe a historical perspective, a brief review of the current situation, the characteristics and classification of the virus, the pathophysiology of the disease, the immune response to VEN, diagnostic methods, traditional and experimental vaccines for EN and a brief description of VEN as an oncolytic agent.

Key words: Newcastle disease, virus, vaccines, pathophysiology.

## I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Newcastle (EN) es una patología de distribución mundial que puede infectar a más de 250 especies de aves y está considerada de notificación obligatoria por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2018). En Perú, la EN es endémica por lo tanto se observan brotes cíclicos en crianzas intensivas, de traspatio, y particularmente en aves de pelea que son numerosas en el país (Ganar *et al.*, 2014; Rojas y Romero, 2017).

Esta enfermedad es causada sólo por el virus de la Enfermedad de Newcastle (VEN) comprendido por un sólo serotipo, comúnmente llamado *Paramyxovirus aviar* tipo 1 (APMV-1), recientemente clasificado como *Orthoavulavirus aviar* 1 (AOAV-1, *Avian orthoavulavirus* 1) (ICTV, 2019) y antes nombrado *Avulavirus Aviar* 1 (AAvV-1, *Avian Avulavirus* 1) (ICTV, 2018). Pertenece al orden Mononegavirales, dentro de este orden se encuentran también el virus de la Rabia y el virus del Ébola, de importancia en salud pública (Adams *et al.*, 2017). La EN es causada sólo por infecciones con VEN virulentos (VENv), los cuales tienen un índice de patogenicidad intracraneana (IPIC) en pollos de un día de edad igual o mayor a 0.7 o presentan tres o más aminoácidos básicos en el terminal C de la proteína F2 y una fenilalanina en el residuo 117 (OIE, 2012).

La EN afecta a un amplio rango de especies de aves con diferente grado de virulencia y patogenicidad (Gogoi *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2015). Para definir su virulencia, el virus fue clasificado en patotipos determinado por los signos clínicos que produce en pollos inoculados experimentalmente, clasificándose de mayor a menor grado de virulencia en velogénico, mesogénico, lentogénico y entéricos asintomáticos (Hanson, 1980). Los virus velogénicos que producen alta mortalidad son separados como EN velogénica viscerotrópica (ENVV), que originan hemorragias en tracto gastrointestinal y signos nerviosos y la EN velogénica

neurotrópico (ENVN) en donde predominan los signos neurológicos con leves signos respiratorios (Alexander y Parsons, 1984). Los virus mesogénicos causan trastornos nerviosos y muerte en aves jóvenes (Miller y Koch, 2013). Actualmente la caracterización estándar en muchos laboratorios se hace mediante análisis filogenético de la secuencia genómica, el cual los clasifica el virus en clase I y II. Hasta la fecha se han caracterizado hasta XVIII genotipos de clase II del VEN (Dimitrov *et al.*, 2016).

En referencia a los signos clínicos en las aves infectadas, estos varían dependiendo de la especie afectada, la virulencia y la dosis infectiva del virus, el estado inmunitario y la edad del ave, haciendo dificultoso el diagnóstico basado en signos clínicos. Los signos observados pueden ser signos respiratorios así como también depresión, diarrea verdosa, signos nerviosos, y muy alta mortalidad que en aves domésticas sin vacuna puede llegar al 100% (Cho *et al.*, 2008).

En cuanto a avicultura, la EN afecta a todas las aves de producción, siendo las más afectadas las aves de postura comercial seguido de los pollos de engorde. Las aves enfermas se deprimen y dejan de consumir alimento o mueren, en consecuencia se ven afectados la ganancia de peso y el peso corporal en pollos de engorde. Asimismo, en las gallinas de postura ocasiona disminución de la producción de huevos, despigmentación de la cáscara y huevos en fáfara. Por esta razón, tiene un impacto económico negativo sobre la producción de carne y huevo (Cho *et al.*, 2008; Khorajiya *et al.*, 2015).

Por otro lado, la bioseguridad y la vacunación son consideradas las principales herramientas de prevención de la enfermedad. Mientras que la bioseguridad juega un rol fundamental en evitar la introducción del agente y su diseminación en las granjas, la vacunación tiene como objetivo proteger contra los signos clínicos de la enfermedad. En este sentido, las vacunas vivas e inactivadas son las más accesibles, de menor costo de manufactura y venta, siendo



las cepas más usadas La Sota, la Hitchner B1, VG-GA y PHYL.MV.42. Asimismo, existen alternativas que se han desarrollado tales como vacunas vectorizadas en Herpesvirus del pavo (HVT) que inmunizan contra Enfermedad de Marek, Gumboro y EN, otro tipo de vacuna recombinante usando genética reversa y como vector el baculovirus que incluyen la porción del gen de la proteína F o HN de VEN, virus ADN, además de vacunas donde se utiliza al VEN como vector (Alders, 2014; Mayers *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta que las cepas de VEN pertenecen a un sólo serotipo, cualquier vacuna de EN potencialmente debería inducir la protección de cualquier VENv. Sin embargo, pequeñas variaciones antigénicas entre las cepas pueden inducir variación en la eficacia de la vacuna y la diseminación del virus. En los últimos años se han desarrollado a través de la genética reversa, vacunas homólogas a las cepas de campo circulantes, las cuales han demostrado reducir la diseminación y eliminación del virus frente a vacunas con cepas clásicas. Las investigaciones en el campo del desarrollo de vacunas más eficaces contra EN favorecería el comercio internacional, a los productores avícolas y a los países en vías de desarrollo donde la avicultura es una fuente de proteína importante (Afonso y Miller, 2013; Grund *et al.*, 2014). Dentro de este marco, el presente trabajo detalla una revisión actualizada de las principales características del VEN, la enfermedad, signos clínicos en aves domésticas y silvestres; así como las vacunas disponibles para su control y el desarrollo de nuevas alternativas en vacunas contra EN, principalmente las vacunas homólogas por genética reversa.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **1. Historia**

La EN fue descrita por primera vez en 1926 en Newcastle-on-Tyne, Inglaterra (el cual es el origen del nombre de la enfermedad) y en la isla de Java (Indonesia), confirmándose como una nueva enfermedad en 1935 (Doyle, 1935). Aparentemente la enfermedad se extendió rápidamente, primero en Asia y luego de manera lenta alrededor del mundo, teniendo entre 16 y 40 años para convertirse en una primera panzootia, con algunas epizootias significativas como la de Newcastle-on-Tyne (Brandly, 1964). En 1944, en EEUU se demostró que el VEN era el causante de la hasta entonces llamada “Neumoencefalitis”, una forma más leve de la enfermedad (Beach, 1944). Luego con la identificación de las cepas de baja virulencia como la Hitchner B-1 y la ligeramente más virulenta La Sota se inició la vacunación (Goldhaft, 1980; Hitchner, 1975). A principios de la década del 70, la industria avícola de todo el mundo se encontraba experimentando una segunda panzootia, la cual surgió a fines de la década de 1960 y tomó solo 4 años en extenderse por todo el mundo, considerablemente más rápido que la primera. A comienzos de la década del 80, emergió una tercera panzootia teniendo su origen en las palomas domésticas (Alexander, 2001). En Perú, la EN fue reportada por primera vez en 1951, en un caso de gallos de pelea (Philipps *et al.*, 1951). Desde ese entonces la enfermedad ha estado presente en forma de epizootias o de brotes aislados en aves de traspatio y en la avicultura comercial de nuestro país (Cortez, 1970; Ravina, 2005).

### **2. Importancia económica**

La EN es una enfermedad altamente contagiosa, de gran importancia en la avicultura industrial y extensiva debido a que produce alta mortalidad en las aves infectadas causando pérdidas económicas directas e indirectas a los productores (Mayers *et al.*, 2017). Obligatoriamente, los países con brotes de EN con virus velogénico o mesogénico deben ser reportados a la OIE, lo cual suspende el comercio internacional en los países exportadores de carne de ave (OIE, 2012). Asimismo tiene importancia

socioeconómica y de bienestar humano en países en desarrollo donde la crianza de aves de traspatio es la única fuente de proteína, fuente de recursos económicos y una herramienta de empoderamiento de la mujer (Alders, 2014; De Bruyn *et al.*, 2017).

Por otro lado, el atlas mundial de enfermedades ganaderas reportó que de 176 países encuestados en el anuario de salud animal de la OIE del 2006 a 2009, EN es la cuarta enfermedad más problemática de las aves de corral, detrás Influenza aviar de alta patogenicidad, Bronquitis infecciosa aviar e Influenza aviar de baja patogenicidad (OIE, 2018).

## 2.1 Situación actual del VEN en el Perú

En el Perú, la enfermedad se encuentra presente, limitada en una o más zonas, por lo cual es considerada endémica (OIE, 2018). Asimismo la notificación de la EN es obligatoria, así como la vacunación (SENASA, 2019a). Por lo tanto, el uso de vacunas en aves domésticas es obligatorio y necesario, conjuntamente con estricta cuarentena combinado con un diagnóstico rápido y bioseguridad. Estas medidas son importantes para mantener la EN bajo control (Dimitrov *et al.*, 2017). Las granjas de producción tecnificada consideran la vacunación contra VEN y realizan programas de vacunación intensiva a sus aves, según el tipo de ave las crianzas no tecnificadas como las aves de traspatio y gallos de pelea son las más susceptibles a la EN, debido a que la mayoría de criadores no realizan vacunación preventiva contra el VEN. En el Perú, el servicio nacional de sanidad agraria (SENASA) realiza anualmente campañas de vacunación en aves de traspatio y de pelea con el objetivo de evitar posibles los focos de infección, además de orientar a los criadores con prácticas de buen manejo y bioseguridad (SENASA, 2019a). Asimismo, desde el año 2003, el gobierno peruano ha aprobado el reglamento de control y erradicación de la enfermedad de Newcastle, con el cual se establecieron las normas para la vacunación, monitoreo y control en casos de brotes (SENASA, 2003).

Recientemente, el SENASA en conjunto con la Asociación Peruana de Avicultura (APA) han implementado un plan piloto para la erradicación de EN en la zona norte de Lima, el cual involucra

crear un sistema de vigilancia para EN en las granjas de producción de aves, en crianzas de traspatio y gallos de pelea, además de programas de prevención y control, como la vacunación de todas las aves dentro de la región norte de Lima, donde existen granjas de reproductores, pollos de engorde, gallinas de postura, aves de traspatio y gallos de pelea (SENASA, 2019b).

Respecto a estudios de prevalencia en el Perú, un trabajo de tesis realizado en la FMV - UNMSM encontró que la prevalencia de VEN en patos de crianza de traspatio del norte de Lima es menor al 1%, por lo tanto no se consideraría a este tipo de ave como fuente de reservorio o infección hacia otras aves domésticas (Buendía, 2014). Otro estudio señala que la prevalencia de anticuerpos contra VEN en el departamento de Lima en aves de crianza de traspatio y de pelea es 10% mientras que la prevalencia de las aves de crianzas tecnificadas con títulos positivos a un desafío de campo fue de 1.8 %, por tanto las crianzasno tecnificadas representan un factor de riesgo para la enfermedad (Ferrer *et al.*, 2008). Por consiguiente, la EN es considerada una enfermedad endémica e importante para las autoridades sanitarias y la industria avícola del Perú ya que activamente se ha implementando reglamentación y planes de prevención y control de la enfermedad a nivel nacional.

### **3. Etiología**

#### **3.1 Clasificación taxonómica**

El virus de la Enfermedad de Newcastle (VEN) conocido como *Paramixovirus aviar* serotipo 1 (APMV-1), es el único serotipo que produce la EN. Recientemente, ha tenido cambios en su nomenclatura, pasando de *Avulavirus aviar* 1 (AAvV-1) (Adams *et al.*, 2017) a *Orthoavulavirus aviar* 1 (AOAV-1, *Avian orthoavulavirus* 1) (Dimitrov *et al.*, 2019). El comité internacional de taxonomía de virus (ICTV) ha creado 3 géneros llamados *Orthoavulavirus*, *Metaavulavirus*, y *Paraavulavirus*, dentro de una nueva subfamilia *Avulavirinae* de la familia *Paramyxoviridae* del orden *Mononegavirales* (ICTV, 2019).

Algunos patógenos humanos, como sarampión, paperas y el virus respiratorio sincitial; y patógenos animales tales como el virus de distemper canino y virus de la peste bovina, muy conocidos pertenecen a la familia Paramyxoviridae. Esta familia está dividida en 4 subfamilias: *Avulavirinae*, *Aquaparamyxovirus*, *Metaparamyxovirinae*, *Orthoparamyxovirinae* y *Rubulavirinae* (Lamb y Parks, 2007; ICTV, 2019). La subfamilia *Avulavirinae* comprende de 3 géneros: *Orthoavulavirus*, *Metaavulavirus*, y *Paraavulavirus*. Dentro del género *Orthoavulavirus* se encuentran todos los Paramixovirus aviares, ahora llamados Orthoavulavirus aviares. Actualmente, han sido identificados 19 serotipos de Orthoavulavirus diferentes: AOAV-1 a AOAV-19, la clasificación ha estado basada en pruebas de inhibición de la hemaglutinación (HI), inhibición de la neuraminidasa (NI) y confirmado por análisis filogenético (Adams *et al.*, 2017; Karamendin *et al.*, 2017; Thomazelli *et al.*, 2017; Amarasinghe *et al.*, 2018; Aziz *et al.*, 2018; Jeong *et al.*, 2018; ICTV, 2019). El AOAV-1 o el Paramixovirus aviar 1 (APMV-1, término más común y usado en el presente trabajo) es el serotipo más caracterizado debido a la severidad de la enfermedad causada por sus cepas en pollos (Kim *et al.*, 2012). La variante antigénica en paloma, antes denominada Paramixovirus de paloma serotipo 1 (PPMV-1, *pigeon Paramyxovirus-1*) también provoca la EN en pollos y está clasificada como AOAV-1 (Kim *et al.*, 2008a; Adams *et al.*, 2017).

### 3.2 Estructura viral y composición química

El VEN es pleomórfico, envuelto y contiene un genoma de ARN de cadena simple no segmentado de 13 – 19 kilobases de sentido negativo (Lamb y Parks, 2007). El análisis de microscopía electrónica del virus parcialmente purificado demostró que las partículas de APMV-1 son pleomórficas pero sobre todo de forma esférica, con un tamaño de 150 a 250 nm. Los APMV-1 poseen una envoltura viral con doble capa de lípidos, la cual es derivada de la membrana celular del huésped donde el virus se replicó. Sobresaliendo la superficie externa de la envoltura se encuentran dos glicoproteínas, llamadas proteína de fusión (F) y proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN). La proteína matriz (M) se encuentra por debajo de la envoltura y está demostrado que desempeña un papel importante en el ensamblaje del virus y gemación del VEN (Miller, 2013). El genoma de ARN está encapsulado por la

proteína nucleocápside viral (N), lo que resulta en la formación de un complejo ribonucleoproteína helicoidal (RNP, *ribonucleoprotein*) que sirve como plantilla para el complejo de ARN polimerasa dependiente de ARN viral compuesto por de la fosfoproteína viral (P) y la proteína polimerasa o proteína grande (L). La proteína de la matriz (M) organiza el ensamblaje de las partículas a través de la interacción con la proteína N en el complejo RNP y los complejos de glicoproteína embebidos en la membrana (Cox y Plemper, 2017) (fig.1).

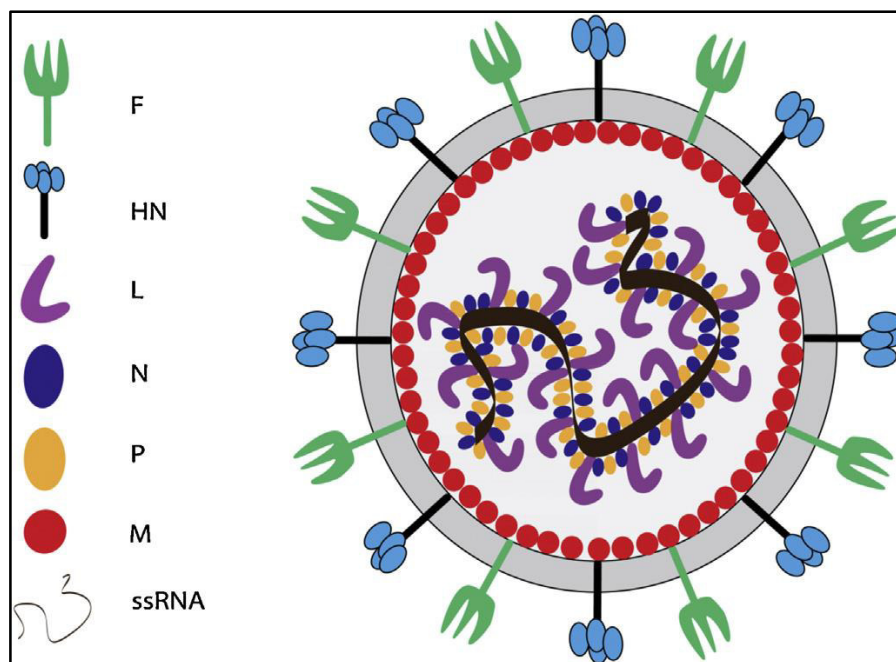


Figura 1. Esquema de la estructura del virus de la enfermedad de Newcastle, donde se muestran las proteínas estructurales. Proteína de fusión (F), proteína hemaglutinina – neuraminidasa, proteína grande (L), proteína de la nucleocápside (N), fosfoproteína (P), proteína de la matriz (M), cadena simple de ARN (ssRNA, single stranded RNA) (Ganar, 2014).

Los aislados de APMV-1 tienen 3 tamaños de genomas; 15,186; 15,192; y 15,198 (Czegledi *et al.*, 2006) de acuerdo con la regla de seis, es decir el tamaño de nucleótidos del genoma es múltiplo de seis (Peeters *et al.*, 2000). El genoma del VEN se compone de 6 genes de proteínas estructurales, enumeradas en sentido de 3' a 5': proteína nucleocápside (N), Fosfoproteína (P), matriz (M), fusión (F), hemaglutinina-neuraminidasa (HN), y la ARN polimerasa dependiente de ARN (RNAP), designado como polimerasa o proteína grande (L) (Lamb y Parks, 2007). La N, P y L están asociados a la nucleocápside, y hay 3 proteínas asociadas a la membrana: proteína M de membrana interior no glucosilado, la proteína glicosilada F y la proteína glicosilada de unión HN (fig. 1) (Miller, 2013). La edición de ARN de la proteína P produce una proteína adicional, la proteína V, cuando 1 residuo de

guanina se agrega al sitio de edición conservado del ARNm por el RNAP (Chambers y Samson, 1982). La proteína V es rica en cisteína y se une al zinc (Steward *et al.*, 1995), y la porción carboxi-terminal tiene actividad anti-interferón, permitiendo que el virus reduzca la respuesta inmune innata del hospedero (Park *et al.*, 2003b). La proteína del hospedero, la actina, también se incorpora a las partículas del virus y se usa para la entrada, replicación y transporte del virus a través de la célula (Munir *et al.*, 2005).

### 3.3 Propiedades biológicas

#### 3.3.1 Actividad hemaglutinante

La capacidad del VEN y otros avulavirus aviares para aglutinar glóbulos rojos (GR) se debe a la unión de la proteína HN a los receptores de ácido siálico en la superficie de los GR (Bang y Libert, 1952). La propiedad de aglutinación del virus y la inhibición por antisueros (Burnet, 1949) han demostrado ser herramientas poderosas en el diagnóstico de la enfermedad. Los GR de pollo por lo general se utilizan en pruebas de hemaglutinación (HA), pero el VEN también causa aglutinación de glóbulos rojos de anfibios, reptiles y otras especies de aves (Ito *et al.*, 1999; Yuan *et al.*, 2011).

Ito (1999) demostró que la capacidad de aglutinar GR no solo varía con la cepa de VEN, también varía con la especie de donde se aisló el virus, y la especie a la que pertenecen los GR. Esto sugiere que las diferencias en el receptor entre las especies pueden afectar la transmisibilidad y replicación de VEN entre especies.

#### 3.3.2 Actividad neuraminidasa

La proteína HN también tiene actividad de enzima neuraminidasa (NA) (mucopolisacárido N-acetil neuraminil hidrolasa) que degrada el receptor de ácido siálico, impidiendo el auto-acoplamiento

de partículas virales y la aglomeración resultante de virus de la progenie. La actividad enzimática también permite que los GR eventualmente se liberen del virus (Lamb y Kolakovsky, 1996).

### 3.3.3 Fusión celular y hemólisis

La proteína de fusión del VEN puede inducir hemólisis o fusión celular de otras células y ésta ocurre a un pH neutro (Homma y Ouchi, 1973; Lamb *et al.*, 2006). La actividad de fusión y la infectividad del virus depende de la división proteolítica por la proteasa del hospedero de la proteína precursora F0 en el heterodímero (F1 y F2) unidos por un enlace disulfuro (Homma y Ouchi, 1973). La escisión también puede ser realizada por proteasas bacterianas (Nagai *et al.*, 1976). La unión del virus al sitio del receptor del hospedero durante la replicación es seguido por la fusión de la membrana del virus con la membrana celular, que puede dar como resultado la fusión de células vecinas, y la formación de células multinucleadas o sincitios. La membrana rígida de los glóbulos rojos por lo general se rompe cuando el virus fusiona sus membranas, causando hemólisis (Miller y Koch, 2013).

### 3.4. Clasificación de Cepas

La nomenclatura sugerida para los aislamientos de VEN es similar a los aislamientos de influenza aviar. El aislamiento debe ser listado por completo la primera vez que se menciona en un documento: AOAV-1/ Especie / País (estado, ciudad o ubicación más específica) / número de aislamiento, nombre u otra identificación única / año de aislamiento, por ejemplo: AOAV-1/Chicken/Arequipa-Peru/VFAR81/2015 (Chumbe *et al.*, 2017b); y posteriormente puede abreviarse como Arequipa-Peru / 2015. Existen aislamientos muy bien caracterizados y se conocen por un nombre como en el caso de LaSota, B1 y la cepa Ulster. No obstante, los virus que tienen el mismo nombre puede diferir (Czegledi *et al.*, 2003). El objetivo importante en la caracterización es agrupar los virus que son similares, generalmente basados en su virulencia. Las propiedades biológicas no relacionadas del VEN varían con las diferentes cepas y aislamientos, y estas propiedades han sido utilizadas para clasificar los aislamientos (Miller y Kock, 2013). Todos los aislamientos de APMV-1 son de un serotipo



porque los anticuerpos de una cepa pueden neutralizar todos los aislamientos de VEN. Sin embargo, es posible que se produzca variación antigénica y se ha sugerido que la especificidad de los anticuerpos inducidos por una vacuna al virus de desafío o brote es importante para reducir la cantidad de virus eliminados en los animales vacunados y en la prevención de la disminución de la producción de huevos en ponedoras (Miller *et al.*, 2007, 2009a; Yang *et al.*, 2017). Por consiguiente, otros autores señalan que la antigenicidad (la producción de anticuerpos vacunales), puede no estar relacionada con la cantidad de virus eliminada de un ave infectada (Dortmans *et al.*, 2012).

#### 3.4.1 Antigenicidad

Mientras todos los aislamientos de APMV-1 son de un serotipo, se han demostrado variaciones antigénicas menores entre diferentes aislados de VEN, mediante las pruebas de neutralización de virus (VN), difusión en gel de agar, anticuerpos monoclonales (mAb) e inhibición cruzada de la hemaglutinación (Alexander *et al.*, 1985; Abenes *et al.*, 1986; Miller *et al.*, 2007). Los anticuerpos monoclonales se han utilizado para colocar cepas de VEN en grupos sobre la base de su capacidad para reaccionar con diferentes mAb (Russell y Alexander, 1983). Asimismo, la tipificación de mAb se ha utilizado para establecer la singularidad de la variante VEN responsable de la panzoótia en palomas y para confirmar su presencia en muchos países (Pearson *et al.*, 1987). No obstante, el análisis genético ha reemplazado el uso de mAb para la tipificación de los aislamientos de VEN (Diel *et al.*, 2012a).

#### 3.4.2 Inmunogenicidad

Respecto a la inmunogenicidad, o la capacidad de una vacuna para proporcionar significativamente mejor protección sobre otras vacunas frente a un desafío específico, puede involucrar la cantidad de anticuerpos producidos, la reducción en el número de aves enfermas o muertas después del desafío, y como se mencionó anteriormente, la disminución de la cantidad de virus virulentos de desafío eliminados al ambiente. Vacunas formuladas con la misma cepa de VEN e incluso clones de VEN pueden no tener la misma inmunogenicidad. Se ha demostrado que los clones de LaSota son menos

protectores que las vacunas formuladas con cepa LaSota de tipo salvaje. La inmunogenicidad de un virus también depende de la vía de administración de la vacuna (Mazija *et al.*, 2010).

### 3.4.3 Test de patogenicidad

Sobre la base de estudios patogénicos, el VEN se clasifica en tres categorías: velogénica (muy virulenta), mesogénica (virulencia moderada) y lentogénica (VENlo o VEN baja virulencia). Se define como promedio de tiempo de muerte (MDT) en embriones de pollo, después de la inoculación del virus en el saco alantoideo, de menos de 60 horas, de 60–90 horas y más de 90 horas, respectivamente. Estos términos ahora también se aplican para designar alta virulencia, virus de virulencia moderada y de baja virulencia independientemente de la prueba de patogenicidad empleada (OIE, 2012). Dependiendo de su sitio de predilección, un VEN velogénico puede ser viscerotrópico o neurotrópico (Alexander, 2001).

El índice de patogenicidad intra cerebral (IPIC) en pollitos de un día, establece los virus lentogénicos con valores IPIC inferiores a 0.7, las cepas mesogénicas virulentas con valores de IPIC iguales o mayores de 0.7 y menor de 1.5, y los virus velogénicos con valores IPIC superiores a 1.5 (Hanson, 1980). Para el IPIC, es necesario 10 pollos SPF de 24 a 40 horas de nacidos, los cuales se inoculan con 0.05 ml de una dilución de 1:10 de VEN isotónico libre de bacterias que contiene el líquido alantoideo con un título de HA superior a 16 y observado diariamente durante 8 días. Las aves tienen una calificación de 0 = normal, 1 = enferma y 2 = muerta. El IPIC es la puntuación media por observación de aves. El IPIC también se usa como un determinante de VEN cuando se requiere reportar a la OIE. Otro ensayo de patogenicidad es el índice de patogenicidad intravenosa (IPIV), en el cual se utilizan pollos de 6 semanas de edad, y puede distinguir VEN velogénico, de VEN mesogénico y lentogénico, aunque, no es muy usado porque los virus mesogénicos, como los velogénicos, están definidos como VENv por la OIE. Con las cepas APMV-1 es común tener sitios de escisión virulentos de la proteína de fusión, pero valores de IPIC mesogénicos con valores de MDT lentogénicos (OIE, 2012). Sin embargo, los índices de patogenicidad pueden aumentar en virulencia con pasajes múltiples en pollos (Alexander y Parsons, 1984). Dado que la OIE ha definido el VEN como una infección con cualquier virus que tiene un IPIC igual o mayor a 0.7, el IPIV no se realiza tan comúnmente como el

IPIC. Mientras la secuenciación del sitio de escisión del gen de la proteína F es aceptable para demostrar virulencia, si el sitio de escisión revelan un VEN de baja virulencia, la prueba de IPIC es requerida por la OIE para la determinación *in vivo* de virulencia del virus (OIE, 2012).

#### 3.4.4 Genotipos o clasificación molecular

Actualmente el análisis filogenético de las secuencias del genoma es el procedimiento estándar adoptado por la mayoría de los laboratorios para caracterizar el VEN. Mientras que los primeros análisis se centraron en secuencias parciales del gen de la proteína F (Aldous *et al.*, 2003), debido a su importancia en la determinación de virulencia, esfuerzos más recientes comparan la proteína F completa o secuencias genómicas completas (Diel *et al.*, 2012b; Munir *et al.*, 2012). Para determinación molecular de la virulencia, la proteína de fusión (F) parcial de 274 pares bases (pb) de longitud, alrededor del sitio donde está el precursor F0 y es cortado a los fragmentos F1 y F2, es suficiente (OIE, 2012). Con bajas tasas de recombinación, pero considerable cambio antigénico en el tiempo, la diversidad genética está representada por grupos de virus asignados en linajes o genotipos (Miller *et al.*, 2009b). Las cepas de APMV-1 se pueden agrupar en 2 clases principales, clase I y clase II (Czegledi *et al.*, 2006). Los virus de clase I son en su mayoría de VENlo encontrados en aves silvestres y los virus de clase II actualmente están divididos en 18 genotipos que representan VENlo y VENv (Courtney *et al.*, 2013; Miller y Koch, 2013; Snoeck *et al.*, 2013). Con la adición de genomas más completos disponibles para análisis, un nuevo sistema para definir genotipos basados en una distancia evolutiva media entre grupos genéticos de 10% ha sido sugerido para definir los genotipos actuales y para identificar nuevos genotipos a medida que surgen (Diel *et al.*, 2012a). Mientras la mayoría de los datos de secuencias disponibles son para los virus de clase II que contienen virus vacunales y virus virulentos de brotes, recientemente hay mas disponibilidad de datos de secuencias de genoma completo de VENlo aislados de aves silvestres (Kim *et al.*, 2007).

## 4. Replicación viral

Todos los paramixovirus se replican completamente en el citoplasma. Primero, ocurre la entrada del VEN dentro de la célula hospedera, la cual está mediada por la interacción de las glicoproteínas de la superficie viral (HN y F), la proteína HN se une a los receptores de ácido siálico de la superficie celular, resultando en la activación de la proteína F para la fusión del virus con la célula hospedera (fig. 2) (Gogoi *et al.*, 2017).

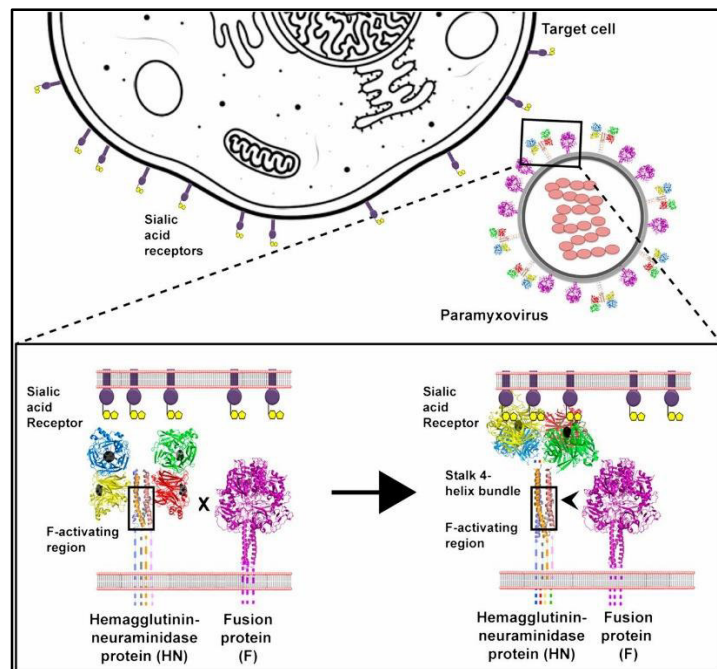


Figura 2. Las glicoproteínas F y HN median la entrada del VEN en las células diana (Sayantan, 2012, disponible en: <https://www.pnas.org/content/109/39/E2625/1>).

Mediante endocitosis, la nucleocápside vírica entra en el citoplasma de la célula hospedera, el ARN viral de sentido negativo se libera en el citoplasma y se transcribe para producir el ARNm estructural en modo de gradiente por la ARN polimerasa. La transcripción del ARN genómico viral se produce por medio de la polimerasa viral (complejo P-L); la actividad catalítica de la polimerasa es función de la proteína L, y la proteína P es responsable de la unión del complejo P-L a la nucleocápside (N) (Dortmans *et al.*, 2010).

Las proteínas virales se traducen y doblan usando la maquinaria de la célula huésped, una vez que son producidas suficientes proteínas virales, la N comienza a unirse a la cadena líder, un proceso en que la proteína P actúa como un chaperón para entregar la proteína N al ARN recientemente generado

(Cox y Plemper, 2017) . Está documentado, que el complejo N-P regula el cambio de la transcripción a la replicación (Vidal y Kolakofsky, 1989), pero varios hallazgos también muestran un papel importante para la proteína M en este proceso. Debido a que la proteína M se asocia con la nucleocápside, también puede afectar la transcripción y / o replicación (Ghildyal *et al.*, 2002; Iwasaki *et al.*, 2009).

El complejo P-L es responsable de la replicación del genoma, el genoma ARN de sentido negativo se convierte en una plantilla anti-genoma de sentido positivo para la síntesis de nuevo genoma ARN de sentido negativo. El ARN genómico recién formado luego se envasa dentro de la nucleocápside que se ensambla con la matriz y las glicoproteínas de superficie y liberadas de la célula huésped. La proteína L realiza actividades de modificación postranscripcional tales como encapsulación, metilación, y poliadenilación de los ARNm (Poch *et al.*, 1990). Las proteínas N, P, y L juntas constituyen el complejo de replicación viral (Dortmans *et al.*, 2010; Gogoi *et al.*, 2017).

## **5. Factores de virulencia**

### **5.1 Proteína F**

Se ha demostrado que la glicoproteína de fusión (F) es el determinante importante de la patogenicidad del VEN y es un principal antígeno protector del hospedador (Peeters *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2011). La entrada del virus dentro de las células del huésped requiere la activación de la proteína F de la envoltura viral a través de la escisión o corte de la glicoproteína precursora F0 en F1 y F2. En consecuencia, para la infección de una célula, sólo los virus con una F0 escindida pueden mediar la fusión entre la membrana celular y viral (Peeters *et al.*, 1999). La escisión postraducciona l está mediada por proteasas de la célula del huésped, y los tipos de proteasas capaces de escindir F0 dependen de la secuencia de aminoácidos alrededor del sitio de escisión. La secuencia de aminoácidos del precursor F0 de VENlo se caracterizan por una secuencia de aminoácidos monobásicos en el terminal C de la proteína F2 y una leucina en el terminal N de la proteína F1, 112G-R / K-Q-G-R ↓ L117, y es cortada sólo extracelularmente por proteasas de tripsina presentes en el tracto respiratorio e intestinal. Las cepas de

VEN velogénicas y mesogénicas contienen una secuencia polibásica de aminoácidos, es decir, 3 o más argininas (R) o lisinas (K), en la posición 113 en el terminal C de la F2 y una fenilalanina (F) en la posición 117 en el terminal N de la proteína F1, R / KR-Q-R / K-R ↓ F. La presencia de secuencias polibásicas en el sitio de escisión de la proteína F, en las cepas velogénicas y mesogénicas de VEN, es el sitio de reconocimiento para la furina que se encuentra en la mayor parte de órganos del huésped (Lamb y Parks, 2007). Esta diferencia en la activación de la proteasa es el principal determinante de la replicación sistémica asociada a enfermedad grave de VENv. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos del sitio de escisión de la proteína F es considerado el determinante primario de la virulencia del VEN (Peeters *et al.*, 1999, Panda *et al.*, 2004).

## 5.2 Proteína HN

Diversos estudios han contribuido a esclarecer el rol de HN a la virulencia, sin embargo esto se complica por la estrecha asociación de HN y F, que pueden requerir cambios en ambos HN y F para mantener la interacción. Aparentemente la longitud de la proteína HN no tendría efecto sobre la virulencia (Romer-Oberdorfer *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2016). No obstante, un reciente estudio ha demostrado que la proteína HN tiene importancia en la modulación de la virulencia del VEN. En el cual usando virus quimera, se encontró una fuerte relación entre el origen de la proteína HN y cambios en el tropismo tisular, replicación y patogenicidad del virus, cuando se alteraba el balance entre el reconocimiento de receptores, NA y la actividad de promoción de fusión (Jin *et al.*, 2017).

## 5.3 Proteína V

La proteína P codifica una proteína adicional llamada proteína V desde un segundo marco de lectura abierta (ORF) que es accedido por un mecanismo de cambio de marco cotranscripcional conocido como edición de ARN (Steward *et al.*, 1993). La proteína V del VEN es una proteína multifuncional, con un importante rol en la replicación viral del virus *in vivo* como un inhibidor de interferón alfa / beta (IFN-  $\alpha/\beta$ ), localizado en su dominio terminal-C, en consecuencia permite evadir

la respuesta del huésped interrumpiendo la respuesta del interferón tipo I y II, así como la inducción de la apoptosis de la célula infectada (Jang *et al.*, 2010; Paldurai *et al.*, 2014). Esta proteína también está estrechamente relacionada con la patogenicidad debido a que la pérdida de expresión de la proteína V resulta en virus altamente atenuados *in vitro* e *in vivo*, lo que indica que juega un papel importante en la virulencia de VEN (Mebatsion *et al.*, 2001). Adicionalmente es hospedero-específica ya que la actividad de la proteína V se restringe solamente a hospederos aviares (Park *et al.*, 2003a). La proteína V suprime la señalización de IFN dirigiéndose selectivamente a la proteína STAT1 para la degradación (Huang *et al.*, 2003). Además de bloquear la señalización de IFN, la proteína V puede interferir con MDA5 y LGP2 para limitar la inducción de interferón (Childs *et al.*, 2012).

#### 5.4 Complejo de replicación (Genes NP/P/L)

Una correlación entre la virulencia y el nivel de replicación viral ha sido observada en muchos virus. Las proteínas NP, P y L forman el complejo de replicación y su implicancia en la virulencia del VEN también ha sido estudiada por genética inversa (Rout y Samal, 2008; Dortmans *et al.*, 2010). Mientras en un estudio, el intercambio de proteína L solo tuvo un pequeño efecto sobre la virulencia (Rout y Samal, 2008), otro estudio, en el que los genes se intercambiaron de una cepa de VEN<sub>v</sub> y VEN<sub>lo</sub>, indicó que las 3 proteínas (NP, P y L) tenían un significativo efecto sobre la virulencia del VEN (Dortmans *et al.*, 2010). Asimismo, el pasaje del APMV-1 en cerebro de pollo reveló 3 mutaciones: 2 en L y 1 en la proteína P, que se correlacionó con un aumento de la replicación junto con una mayor virulencia en las aves (Dortmans *et al.*, 2011b).

En suma, los estudios indican que la virulencia del VEN es una característica compleja debido al efecto de múltiples genes, siendo la secuencia de escisión de la proteína F0 con aminoácidos polibásicos, el requisito mínimo de virulencia (Miller y Koch, 2013).

## 6. Epidemiología

## 6.1 Incidencia y distribución

La presencia de la EN es mundial. En Latinoamérica, entre el 2016 y 2018 se ha reportado brotes de VENv en países como Belice, Colombia, Ecuador, Haití, México, Nicaragua y Venezuela. Adicionalmente, en el mismo periodo de tiempo, se han reportado oficialmente 26 brotes de EN en aves domésticas en el Perú (OIE, 2019). Después de dos décadas de su identificación por primera vez en 1926 en el Reino Unido e Indonesia, la EN alcanzó proporciones panzoóticas (Alexander, 2001).

Según Alexander (2001), los brotes de EN se desarrollaron en 4 panzootias en todo el mundo, siendo la ultima a comienzos de la década del 80. Actualmente, el virus es ahora endémico o causa epizootias en escala global a pesar del uso de vacunas en las poblaciones de aves de producción (Dimitrov *et al.*, 2017a).

Por otro lado, las cepas de APMV-1 están clasificadas filogenéticamente, según la secuencia del gen F, en clase I y clase II, siendo la clase II diferenciada en genotipos basados en variaciones genéticas y geográficas. Los APMV -1 de clase II son frecuentemente aislados de aves de corral, con ocasionales hallazgos en aves silvestres, y exhiben un rango más amplio de virulencia (Diel *et al.*, 2012a). Las aves acuáticas, los cormoranes y las palomas son reservorios naturales de todos los patotipos APMV -1 (Rahman *et al.*, 2018), excepto los virus velogénicos viscerotrópicos para los cuales no se han identificado reservorios naturales (Rehman *et al.*, 2018).

Asimismo, los genotipos I y II dentro de la clase II incluyen aislamientos de alta y baja virulencia, estos últimos a menudo utilizados como vacunas. Los virus de los genotipos III y IX que surgieron hace décadas ahora son muy infrecuentes de aislar, pero se pueden encontrar en aves domésticas y silvestres en China. Al contrario, los genotipos V, VI y VII están conformados por solamente virus virulentos y son responsables de la mayoría de los brotes recientes en aves domésticas y silvestres, además altamente circulantes y han sido aislados en diferentes países. Así, por ejemplo, el APMV-1 de paloma figura en la clase II, del genotipo VIb. Por el contrario, los VENv de los genotipos XI (Madagascar), XIII (principalmente en el sudoeste de Asia), XVI (América del Norte) y XIV, XVII y XVIII (África) parecen tener una distribución geográfica más limitada y se han aislado principalmente de aves de corral (Dimitrov *et al.*, 2016).



En Perú, los virus circulantes aislados en la última década pertenecen al genotipo XII (Chumbe *et al.*, 2015; Chumbe *et al.*, 2017b) y genotipo VII (Conza, 2012) de la clase II. Asimismo, los virus del genotipo XII han sido aislados en Colombia (Berhane *et al.*, 2017), y gansos en China durante 2010-2011 (Diel *et al.*, 2012a; Liu *et al.*, 2013). Los virus del genotipo XII han sido patotipificados como velogénicos mediante la prueba estándar de IPIC y caracterización genética (Chumbe *et al.*, 2015; Chumbe *et al.*, 2017b; Diel *et al.*, 2012a; Diel *et al.*, 2012b; Hines *et al.*, 2012). Debido a que el virus del genotipo XII no ha sido detectado en aves silvestres, existe una falta de conectividad migratoria entre los brotes de China, Perú y Colombia, para poder determinar que taxones aviares estarían vinculados en la epidemiología de este genotipo que aún es desconocido (Berhane *et al.*, 2017; Chumbe *et al.*, 2017b; Dimitrov *et al.*, 2016).

## 6.2 Hospedadores Naturales

El VEN puede infectar a otras especies animales aparte de las aves, desde reptiles hasta el hombre (Lancaster, 1966). Las infecciones por VEN se han establecido en al menos 250 especies de aves que representan a 27 de las 50 órdenes de la clase (Kaleta y Baldauf, 1988; Spickler, 2008). Aparentemente todas las aves son susceptibles a la infección pero algunas especies pueden requerir una dosis infecciosa más alta de VEN que otras especies para ser infectadas, como sucede con los pavos en comparación con los pollos (Aldous *et al.*, 2010). Asimismo, la susceptibilidad también dependerá del tipo de cepa del virus (Miller y Koch, 2013).

### 6.2.1 Aves silvestres

Los aislamientos de VEN se han obtenido con frecuencia de aves acuáticas migratorias y otras aves silvestres acuáticas. La mayoría de estos aislamientos han sido de baja virulencia para los pollos y de patotipos similares a los virus entéricos asintomáticos (Brown y Bevins, 2017). Los brotes más importantes de VENv en aves silvestres han sido aquellos reportados en cormoranes de doble cresta (*Phalacrocorax auritus*) en América del Norte durante la década de 1990, los cuales fueron aislados de

aves muertas (Kuiken *et al.*, 1999), algunos de estos brotes ocasionaron la enfermedad también en granjas de pavos (Heckert, 1993). Aunque los primeros reportes de la EN en cormoranes y especies similares fueron a finales de la década de 1940 en Escocia (Blaxland, 1951) y en Quebec en 1975 (Cleary, 1977). De igual manera, las aves de la familia Columbidae (palomas y tórtolas) están implicadas como especie reservorio para cepas virulentas, junto con los cormoranes de cresta doble. Asimismo se ha vinculado a las aves migratorias como responsables de la introducción primaria del VEN a aves domésticas, tal como sucedió en Reino Unido donde en 1997 se reportó brotes en aves de producción causados por virus genéticamente similares a los encontrados en países de Escandinavia (Alexander *et al.*, 1998). Adicionalmente, el VEN se ha aislado de cisnes blancos (*Cygnus olor*), aves acuáticas, aves playeras, patos silvestres, gaviotas pero todos estos virus han sido de cepas lentogénicas. Estos hallazgos indican que la transmisión del VEN puede ocurrir entre aves silvestres y aves de corral, y que las aves silvestres están expuestas a los Avulavirus aviáres, contribuyendo al mantenimiento viral en el medio ambiente (Brown y Bevins, 2017).

Por otro lado, el monitoreo de aves silvestres en cuatro continentes entre 1997 y 2014 dio como resultados aislamientos repetitivos de VEN derivado de vacunas, los cuales fueron encontrados en 17 especies de aves, siendo más frecuentemente detectado en Columbiformes y Anseriformes (Ayala *et al.*, 2016). Con referencia a las cepas virales más detectadas estas correspondieron a los más utilizados como vacunas: La Sota y B1. Estos hallazgos son inquietantes debido a que los pasajes virales a través de especies de aves silvestres puede hacer una presión selectiva sobre los virus, que podría conducir a una deriva antigénica o aumentar la virulencia. Sin embargo, no hay documentado casos de cepas vacunales recombinadas con cepas salvajes en aves silvestres; No obstante, las investigaciones hasta la fecha sobre la dinámica del VEN en las aves silvestres ha sido limitada y una exploración más completa podría determinar mejor si esto está ocurriendo (Brown y Bevins, 2017). Existe, sin embargo, un caso de una cepa salvaje de baja virulencia de clase II del genotipo I que mutó a una cepa virulenta después de circular durante muchos meses en miles de pollos que llevaron al brote de EN de 1998 en Australia (Gould *et al.*, 2001).

### 6.2.3 Aves domésticas

Las cepas virulentas de VEN se han aislado de todos los tipos de aves criadas comercialmente, que van desde palomas a las avestruces (Miller y Koch, 2013).

## 6.3 Transmisión, portadores, vectores y diseminación

En cuanto a la transmisión del VEN, ésta es horizontal, las aves infectadas eliminan el virus en las secreciones orofaríngeas y materia fecal (Kinde *et al.*, 2005). Las aves susceptibles pueden infectarse por inhalación de polvo contaminado o virus en aerosol (Li *et al.*, 2009), o por ingestión de dicho material. La infección por inhalación del virus en aerosol es reproducido con éxito en la aplicación de vacunas vivas contra el VEN utilizando nebulizadores (Mazija *et al.*, 2010). La ingestión de heces o carcasas contaminadas pueden causar infección en pollos (Alexander *et al.*, 1985) y rapaces (Jindal *et al.*, 2010; Haddas *et al.*, 2014). Otro ejemplo demostrativo de infección oral, es la aplicación de vacunas vía agua de bebida a pollos de engorde (De Bruyn *et al.*, 2017). Mientras que los pollos inmunizados pueden expulsar VENv por 6–9 días después del desafío o hasta que mueran (Kapczynski y King, 2005), los loros, cormoranes, y palomas pueden tener un tiempo de eliminación prolongado del VENv, generalmente en heces y sin signos clínicos (Wakamatsu *et al.*, 2006a; Brown y Bevins, 2017).

Por otro lado, la transmisión vertical de VEN de padres a progenie es difícil de comprobar por la posibilidad de que la infección ocurra a las crías por heces contaminadas a través de grietas de la cáscara del huevo o por exposición a un ambiente contaminado. Existen reportes de VENv aislados de huevos embrionados (Capua *et al.*, 1993), en aves de un día de nacidas, aves no nacidas muertas dentro de la cáscara (Roy y Venugopalan, 2005). Aun así, el VEN tiene tropismo por el oviducto y el útero, los embriones pueden infectarse pero estos mueren antes de la eclosión (Sa *et al.*, 2016). Así mismo hay un estudio donde huevos embrionados inoculados experimentalmente con 1 dosis letal media del virus virulento sobrevivió y se eliminó virus en las heces (Chen y Wang, 2002). En conjunto, la transmisión vertical no está comprobada en infecciones naturales, existiendo dudas respecto a su importancia (Miller y Koch, 2013).

En relación con los portadores, cualquier ave puede ser infectada con VEN de baja virulencia, reaccionar inmunitariamente, luego ser infectado con un VENv, y sin demostrar signos clínicos eliminar el VENv a aves susceptibles, actuando como portador de la EN. Sin embargo, como se ha indicado, los cormoranes adultos aparentemente sanos, las palomas (Alexander, 2000b) y los loros (Senthuran *et al.*, 2005; Daut *et al.*, 2016) a menudo se encuentran infectados y, posiblemente, excretando el VEN de manera crónica (Senthuran *et al.*, 2005). A pesar de este hecho, los estudios epidemiológicos moleculares realizados en secuencias virales de brotes en aves domésticas no implican los virus de estas especies. Es decir, las cepas aisladas de las palomas suelen ser variantes de paloma de APMV-1 y virus aislados de cormoranes son diferentes de las cepas de pollo (Kim *et al.*, 2008a; Miller *et al.*, 2010). Probablemente las aves silvestres no sean importantes en la propagación secundaria de VENv. Mientras que algunas cepas de VEN tienen un tropismo para una especie específica, este tropismo puede cambiar si el virus realiza múltiples pasajes en una nueva especie aviar (Dortmans *et al.*, 2011b), que puede ocurrir si las medidas de bioseguridad no están completamente implementadas (Alders, 2014).

Existe falta de evidencia de que los humanos, otros mamíferos o insectos son vectores biológicos de la diseminación de EN, aunque los humanos pueden infectarse y desarrollar conjuntivitis. Sin embargo, la propagación del virus por los humanos es más factible mediante el transporte de fomites contaminados (Dortmans *et al.*, 2012). Equipos contaminados con VEN, ropa, calzado, alimento, agua, vacunas, productos avícolas, y aves infectadas con VEN (domésticas o silvestres) movilizadas o puestas en contacto con aves susceptibles donde el virus puede ser inhalado o ingerido pueden llevar a la diseminación de EN (Burridge *et al.*, 1975; Jorgensen *et al.*, 2000; Alders, 2014). Las aves migratorias y aves importadas ilegalmente han sido implicadas en la introducción de la enfermedad en ciertas regiones (Ayala *et al.*, 2016; Brown y Bevins, 2017). Adicionalmente las moscas han sido consideradas como vectores de VENv aunque las cantidades encontradas en éstas fue muy pequeño para ser denominadas como vectores competentes (Chakrabarti *et al.*, 2007).

## 7. Patogenie

### 7.1 Periodo de incubación

El tiempo entre la exposición al VEN y el desarrollo de los signos clínicos varían dependiendo de la especie del hospedero, el estado inmunitario del hospedero frente al VEN, la edad del hospedero, sanidad del hospedero, virulencia del virus, la dosis o cantidad de virus recibido, e incluso la vía de exposición o infección. El período de incubación del VEN en una infección natural varía entre 2 y 15 días, con un promedio de 5 a 6 días, pero puede tomar de 3 a 4 semanas en algunas circunstancias. La infección experimental con una cepa de VEN virulenta viscerotrópica en pollos generalmente lleva un período de 1 a 4 días de incubación dependiendo de la dosis desafiada. La transmisión por aerosol puede tener un tiempo de incubación más corto que una infección a través de la ingestión del virus (Miller y Koch, 2013).

### 7.2 Signos clínicos en aves domésticas

Al igual que en el periodo de incubación, los signos clínicos observados también varían según los factores anteriormente mencionados. Asimismo, los signos clínicos no son específicos de la enfermedad, y se pueden confundir con otras enfermedades respiratorias como influenza aviar de alta patogenicidad, laringotraqueitis infecciosa aviar, bronquitis infecciosa y la micoplasmosis (Alexander y Senne, 2008). En aves sin vacuna infectadas con cepas virulentas viscerotrópicas, los signos se presentan con apatía y depresión severa a los 2 días después de la infección (fig. 3), seguido con 100% de mortalidad al tercer o cuarto día (Susta *et al.*, 2011).

Entre los signos clínicos observados en las aves domésticas están la conjuntivitis, ronquera, edema facial, secreción ocular y/o nasal, depresión, plumas rizadas (fig.3), disnea, hipertermia, anorexia, apatía e hipotermia antes de la muerte. Igualmente, las heces se vuelven verdes y acuosas, la cresta adquiere un tono azulado a medida que el ave se vuelve cianótico (Cattoli *et al.*, 2011). Por otro lado,

las gallinas ponedoras adultas reciben múltiples vacunas contra VEN durante su ciclo de producción, presentando una inmunidad persistente, por lo cual los signos clínicos respiratorios o mortalidad podría no presentarse, aunque sí se puede observar caída en la producción de huevos, despigmentación de la cáscara, huevos en fáfara, delgadez y/o deformaciones de la cáscara (Bwala *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2008).



Figura 3. Aves infectadas con el VEN mostrando signos de depresión, edema facial y plumas erizadas. (Laboratorio de Patología Aviar FMV-UNMSM).

La presentación clínica en pollos infectados con cepas de VEN virulentas neurotrópicas pueden parecer excitables e hiperométricas a los 3 o 4 días después de la infección. Aproximadamente 5 días después infección, temblores en la cabeza o musculares, tortícolis y parálisis de un ala o una pierna puede ocurrir, y usualmente las lesiones macroscópicas están ausentes. Típicamente estas aves están vivaces y alertas, y muere por la incapacidad de alcanzar comida y agua 9 o más días después de la infección. La mortalidad suele ser de alrededor del 50% con mayor mortalidad en aves más jóvenes. En las cepas mesogénicas por lo general, se produce una mortalidad baja o nula en pollos de 4 semanas de edad, y presenta signos neurológicos como temblores de cabeza, tortícolis y parálisis (Kommers *et al.*, 2001; Susta *et al.*, 2011). Las cepas de palomas en pollos pueden no presentar signos clínicos (Kommers *et al.*, 2001). Asimismo, en un estudio realizado en la FMV - UNMSM, las codornices son susceptibles al VEN, desarrollando signos clínicos respiratorios, nerviosos y digestivos como en los pollos, aunque la mortalidad puede llegar hasta un 20% (Quevedo *et al.*, 2009).

### 7.3 Signos clínicos en aves silvestres

Las aves acuáticas como los patos, gansos y cormoranes son menos susceptibles al APMV-1 en comparación con los pollos (Brown y Bevins, 2017). Estas aves, generalmente se consideran portadores de APMV-1 a largo plazo, pero cuando presentan cuadro clínico se puede observar elevada temperatura corporal, mucosidad oral en exceso, cloaca seca, diarrea acuosa y verdosa, intentos de comer y beber sin éxito, apatía, anorexia, enrojecimiento, edema en el párpado y emaciación (Kuiken *et al.*, 1999; Dai *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2014; Rehman *et al.*, 2018). Los patos pueden mostrar hasta un 70% de disminución en la producción de huevos, 80% de morbilidad y 67% de mortalidad (Shi *et al.*, 2011; Zhong *et al.*, 2015); sin embargo, la mortalidad de los patos varía según las diferentes razas, cepas de virus y dosis de virus (Shi *et al.*, 2011). Algunas aves también muestran debilidad en las patas y el ala junto con parálisis incompleta unilateral o bilateral y los efectos de esta parálisis aumentan con la progresión de la enfermedad (Brown y Bevins, 2017). El pato y el ganso también muestran signos neurológicos como temblores musculares, descoordinación muscular, círculos y torceduras de cabeza y cuello (Dai *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015). Estos signos clínicos desaparecen según el estado de infección; los afectados levemente se recuperan antes y las aves gravemente afectadas pueden recuperarse después de 15 días de infección (Wu *et al.*, 2015; Rehman *et al.*, 2018).

Por otro lado, en las palomas, la infección de APMV-1 de paloma muestra signos relacionados al sistema nervioso central que están asociados con una alta tasa de mortalidad. La infección de una cepa viscerotrópica muestra alteraciones en el riñón con signos iniciales de poliuria. El VEN aislado de las palomas es mayormente de patotipo mesogénico (Brown y Bevins, 2017). En referencia a las rapaces, se ha descrito que los halcones infectados con APMV-1 muestran inicialmente signos gastrointestinales como anorexia, vómitos e íleo paralítico. Posteriormente en el curso de la enfermedad se desarrollan signos del sistema nervioso central, los cuales están asociados con ataxia, tics en la cabeza, temblores, parálisis del ala y la pierna y raramente tortícolis (Wernery *et al.*, 1992; Wernery, 2016).

Por otro lado, las aves psitácidas (loros, periquitos y guacamayos) han demostrado la capacidad para eliminar virus infecciosos durante varios meses hasta un año después de la infección, principalmente a través de las secreciones respiratorias y las heces sin signos aparentes (Alexander, 2000a; Brown y Bevins, 2017). En las aves psitácidas, los signos clínicos varían desde inaparentes hasta enfermedad neurológica grave. El período de incubación generalmente es corto (2–3 días) aunque puede llegar hasta 14 días (Terregino y Capua, 2009). Los signos clínicos en aves infectadas con VENv incluyen temblores, recumbencia lateral, dificultad respiratoria, diarrea verdosa, plumaje erizado, tortícolis y frecuentemente la muerte. En este reporte, las aves afectadas fueron el loro Amazona de cabeza amarilla (*Amazona ochrocephala oratrix*), loro Amazona de nuca amarilla (*Amazona ochrocephala auropalliata*), cacatúa nina o cockatiel (*Nymphicus hollandicus*), y pericos del género *Aratinga spp.* (Panigrahy *et al.*, 1993).

En otro estudio, los periquitos australianos (*Melopsittacus undula*), loros Amazona y pericos infectados con un VENv aislado de un loro Amazona, causó principalmente signos neurológicos que consisten en temblores, ataxia, caída de las alas y parálisis uni o bilateral de piernas que culminó alrededor de 2 semanas post infección. Los animales con parálisis bilateral de las piernas murieron, mientras que aquellos con parálisis de una sola pierna se adaptaron a la condición o se recuperaron. Los periquitos australianos mostraron los signos más severos, seguido de los loros amazona y pericos. Además estas aves fueron capaces de propagar el virus e infectar a sus compañeros de jaula. En el caso de los canarios (*Serinus canarius*) se observa enfermedad clínica variable, en una infección por VENv causó eliminación viral y mortalidad acumulada del 25%; sin embargo, no se observaron signos clínicos característicos antes de la muerte (Erickson *et al.*, 1977).

#### 7.4 Lesiones macroscópicas

Igualmente que en los signos clínicos, las lesiones macroscópicas no son patognomónicas. Es probable que las lesiones estén ausentes en las aves vacunadas y posiblemente en aves no vacunadas. Aunque, en las aves domésticas con infecciones por VENv viscerotrópico son muy compatibles la



presencia de lesiones como hemorragia y necrosis de tejidos linfoides asociados al intestino como las placas de Peyer y tonsilas cecales, así como también otros tejidos linfoides presentes en el párpado inferior, molleja, proventrículo (fig. 4), timo, bursa (fig. 5), y bazo, en este último también se presenta agrandamiento y ocasionalmente congestión (Wakamatsu *et al.*, 2006a; Cattoli *et al.*, 2011; Susta *et al.*, 2011).



Figura 4. Hemorragias difusas en mucosa de la molleja y proventrículo en un pollo de engorde infectado con VEN. (Laboratorio de Patología Aviar FMV-UNMSM).



Figura 5. Hemorragias en la mucosa de la bursa de Fabricio en un pollo de engorde infectado con VEN. (Laboratorio de Patología Aviar FMV-UNMSM).

En referencia a lesiones graves en el sistema nervioso central, éstas no son observadas en cualquier infección por VENv. Lesiones en las vías respiratorias son raras (Cattoli *et al.*, 2011), excepto

para el engrosamiento de los sacos aéreos por infección secundaria (Beard y Hanson, 1984). En pollos, se observa consistentemente la necrosis y hemorragia de las amígdalas laríngeas en la porción craneal de la tráquea en infecciones con virus virulento viscerotrópico (Wakamatsu *et al.*, 2006a; Cattoli *et al.*, 2011). Asimismo, en las aves de postura se puede encontrar peritonitis con yema de huevo, atrofia de folículos y oviducto degenerado (Bwala *et al.*, 2012; Khorajiya *et al.*, 2015). Por otro lado, los cormoranes infectados con VEN a menudo se presentan con signos neurológicos, junto con hemorragias intestinales (Banerjee *et al.*, 1994; Kuiken *et al.*, 1999). En otros animales silvestres como los patos y gansos infectados con APMV-1, éstos muestran lesiones graves en órganos linfoides como bursa, bazo, timo, leve a severa traqueítis, aumento de tamaño de riñones, necrosis del páncreas, congestión en meninges y en cerebro además de edema cerebral difuso, hemorragias focales en la mucosa del proventrículo e intestino (especialmente duodeno y parte superior del yeyuno) (Kinde *et al.*, 2005; Dortmans *et al.*, 2011a; Pedersen *et al.*, 2016). Adicionalmente, se ha reportado atrofia bursal, timo hemorrágico y esplenomegalia con áreas necróticas blancas en gansos y patos infectados con APMV-1 (Pedersen *et al.*, 2016; Brown y Bevins, 2017).

## 7.5 Histopatología

Algunas de las lesiones histopatológicas más comunes en pollos y pavos para VENv incluyen necrosis con depleción linfoide en tonsilas cecales, bazo, timo, párpado y bursa; aerosaculitis histiocítica; aerosaculitis linfohistiocítica; gliosis con manguito perivascular de células mononucleares en médula, cerebelo y tronco cerebral; peritonitis con material de yema con infiltración de macrófagos en el espacio de la subserosa del oviducto; miocarditis necrótica; necrosis de médula ósea; necrosis en páncreas, timo e hígado; necrosis y ulceración de la mucosa intestinal; y traqueítis ulcerativa hemorrágica. En las infecciones por VENlo, en pollos y pavos usualmente se producen traqueítis linfoplasmocítica con deciliación (Abenes *et al.*, 1986; Lam, 2003; Alexander, 2009).

## 7.6 Respuesta Inmunitaria

### 7.6.1 Inmunidad innata

La respuesta inmune innata comprende factores que existen antes del inicio de una infección, y son capaces de eliminar o responder rápidamente ante los agentes patógenos. Los componentes primarios de la inmunidad innata en las aves de corral son (a) barreras físicas y químicas, como las plumas y piel, epitelios y producción de moco; (b) células fagocíticas, incluyendo macrófagos y células asesinas naturales (células NK, *natural killers*); (c) proteínas de complemento y mediadores de la inflamación; y (d) citoquinas. En general, la respuesta inmune innata a la infección por virus es una reacción inmediata diseñada para controlar e inhibir el crecimiento y propagación del virus y ayuda en el desarrollo de la protección patógeno-específica a través de la respuesta inmune adaptativa.

Las primeras reacciones del sistema inmune innato son utilizar receptores codificados de línea germinal, conocidos como receptores patrón de reconocimiento (PRR's, *pattern recognition receptors*), los cuales reconocen marcadores moleculares conservados evolutivamente de los microorganismos infecciosos, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* o PAMP's) (Kapczynski *et al.*, 2013).

El reconocimiento de PAMP's por PRR's, ya sea sólo o en heterodimerización con otros PRR's, por ejemplo, receptores tipo toll (TLR, *toll like receptors*); proteínas con dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD, *nucleotide-binding oligomerization domain proteins*); ARN helicasas, como el gen inducible de ácido retinoico 1 (RIG-I, *retinoic acid-inducible gene 1*) o MDA5; lectinas tipo C, inducen señales intracelulares responsables de la activación de genes que codifican citoquinas proinflamatorias, factores antiapoptóticos y péptidos antimicrobianos. El virus es reconocido primero por las proteínas centinela del hospedero, incluyendo proteínas TLR y NOD, produciendo una señalización rápida y activación del factor de transcripción que conduce a la producción de factores solubles que incluyen interferón y citoquinas, diseñados para limitar e interrumpir la replicación viral (Kapczynski *et al.*, 2013).

Según Rue (2011), en los pollos de engorde existe una fuerte y rápida inducción de los genes de respuesta proinflamatoria: IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN-  $\gamma$ , interleucina (IL) -1 $\beta$  e IL-6 en leucocitos esplénicos infectados con una cepa virulenta de VEN, CA02, a las 6 h.p.i. (horas pos infección). Por otra parte, los experimentos *in vivo* para comparar la respuesta relativa del hospedero a los VEN virulento y cepas de baja virulencia como LaSota no han sido posibles, ya que LaSota no llega a replicarse en el bazo sino que lo hace en el sitio de inoculación (Wakamatsu *et al.*, 2006b; Wakamatsu *et al.*, 2006c). Mientras que a las 24 h.p.i., en un estudio *in vivo* (Rue *et al.*, 2011) detectó varios genes asociados a la respuesta innata temprana incrementados, estos incluyen: citoquina proinflamatoria IL-6, proteína inflamatoria macrófago quimioquina 3 alfa (MIP-3 $\alpha$ , *chemokine macrophage inflammatory protein-3 alpha*), gen de resistencia myxovirus (Mx, *myxovirus resistance gene*), lisozimas, proteínas inductoras de interferón con tetratricopéptido 5, ISG12-2, proteína asociada a diferenciación melanoma 5 (MDA5), y precursor de IFN- $\gamma$ .

Posteriormente, a las 48 h.p.i. varios otros marcadores de la respuesta inmune innata a VEN que a las 24 h no estaban inducidos, se detectaron incrementados, estos fueron: iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-8 e IFN- $\gamma$ . Además se ha demostrado que después de la infección con VENv los fibroblastos de embrión de pollo producen IFN- $\gamma$  pero poco a ningún IFN- $\beta$  (Schwarz *et al.*, 2004). Asimismo, el incremento notable de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y óxido nítrico (NO) en bazo y suero respectivamente es una potencial respuesta innata destructiva en los pollos frente a la infección de VEN, probablemente debido a la fuerte replicación y rápida mortalidad del virus en las aves de corral, esto sugiere que el NO contribuye más a la mortalidad que a la recuperación (Kapczynski *et al.*, 2013).

La respuesta aumentada del hospedero frente a los VENv, junto con la observación de daño patológico severo, es desconcertante considerando que todos los VEN codifican el gen V, que funciona para suprimir IFNs de clase I y se ha considerado perjudicial para el hospedero, y una posible causa del efecto patológico (Rue *et al.*, 2011). En cualquier caso, es evidente que los VEN de baja virulencia estimulen una respuesta inmune innata inferior en comparación con los VENv que induce significativamente mayor nivel de respuesta (Kapczynski *et al.*, 2013).

En los últimos años, estudios similares se han realizado sobre la susceptibilidad y la respuesta inmune innata en las aves acuáticas (patos y gansos), las cuales son menos susceptibles al VEN en comparación con los pollos. La razón principal para una menor susceptibilidad de las aves acuáticas al APMV-1 es la presencia del RIG-I, el cual está ausente en el pollo (Barber *et al.*, 2010) pero está presente en patos y gansos (Sun *et al.*, 2013). RIG-I y MDA5 son la parte más importante de los receptores similares a genes inducibles por el ácido retinoico (RLRs), que detectan el ARN citoplásmico (Yoneyama *et al.*, 2004). Estos sensores pueden detectar los ácidos nucleicos del ARN de sentido negativo, como el APMV-1 y los virus de la gripe (Loo *et al.*, 2008), resultado en la producción de IFN tipo I y III, citoquinas, quimiocinas y la expresión de los genes antivirales (Bowie y Unterholzner, 2008).

Los RLR poseen un rol importante en el reconocimiento de los virus y las respuestas inmunes antivirales en macrófagos, fibroblastos y células dendríticas (Kumar *et al.*, 2006). Es importante notar, que la proteína V de APMV-1 bloquea la activación de la vía de señalización, al interactuar con MDA5, lo que resulta en un bloqueo de una fuerte respuesta antiviral de IFN- $\beta$  en pollos de engorde, en cambio para las aves acuáticas funciona en su reemplazo la vía RIG-I (Anis *et al.*, 2013). Existe una correlación positiva entre la resistencia a la infección por APMV-1 y la expresión de los genes antivíricos, incluidos RIG-I, IRF3, IRF7 e IFN- $\beta$  (Wilden *et al.*, 2009), en el caso de la expresión de RIG-I, se ha demostrado que produce una disminución de la carga de virus *in vitro* e *in vivo*. Se puede concluir, que las aves acuáticas tienen diversos componentes de la inmunidad innata que es probable incrementen su resistencia a VEN (Barber *et al.*, 2010; Rehman *et al.*, 2018).

#### 7.6.2 Inmunidad adaptativa

La respuesta inmune innata por sí sola no es suficiente para asegurar la supervivencia del hospedero después de una exposición a un VENv. Sin embargo, la actividad de las células NK, que son capaces de destruir las células infectadas por el virus, mejora con la edad, es decir, a mayor edad del ave disminuye la susceptibilidad al VEN (Lessard *et al.*, 1997). Una vez que el virus supera la respuesta

innata, las respuestas celular y humoral son iniciadas por el hospedero (Reynolds y Maraqa, 2000b; Lambrecht *et al.*, 2004).

#### 7.6.2.1 Inmunidad celular

La diferenciación de los linfocitos T se produce en el timo, produciendo células capaces de expandirse rápidamente después de ser expuestas al antígeno por segunda vez, proporcionando una inmunidad mediada por células (IMC), que es una inmunidad adaptativa específica. El interferon gamma (IFN  $\gamma$ ), secretado por las células NK, activa los macrófagos y promueve la IMC al primer día después de la infección. Los subtipos de linfocitos T que constituyen las principales células de la IMC son los células colaboradoras T CD4 + (linfocitos T helper) secretoras de citocinas y los linfocitos T citotóxicos CD8 + (CTL). Los linfocitos T citotóxicos (CD8+) son encontrados en células esplénicas de pollos infectados dos veces con el VEN (Sharma, 1999). La inmunidad mediada por células de una respuesta celular T helper tipo 1 (Th1), caracterizada por la producción de IFN- $\gamma$ , puede ser detectada 3 días después de la infección con cepas vacunales vivas contra el VEN (Timms y Alexander, 1977), proporcionando así señales para el desarrollo de una respuesta humoral en el ave. A diferencia de la medición de anticuerpos a través de la prueba de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o la prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI), las pruebas de IMC son más laboriosas y requieren procedimientos más específicos. Las pruebas para IMC incluyen la estimulación de linfocitos para inducción de IFN- $\gamma$ , respuesta celular para reconocer antígeno o mitógeno a través de la proliferación, citometría de flujo de linfocitos, y niveles de citotoxicidad observados por las células T CD8 + específicas de VEN a células diana infectadas con VEN (Kapczynski *et al.*, 2013).

Adicionalmente, cuando se compara la respuesta de la IMC en grupos de aves que recibieron vacunas vivas y aves con vacunas inactivadas, los resultados indican un aumento de la IMC con la vacuna viva contra el VEN. En tal sentido, el VEN estimula tanto el complejo de mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I (CD8 +) y II (CD4 +) en el hospedero. La IMC derivada de las vacunas inactivadas tardan más tiempo en desarrollarse y la respuesta no es robusta. La IMC derivada

de vacunas inactivadas parece ser estimulada a través de linfocitos CD4 + y presentación de MHC clase II que impulsa la formación de anticuerpos a través de secreción citoquinas (Lambrecht *et al.*, 2004). Asimismo la virulencia de la vacuna tiene un rol en la IMC, una cepa vacunal VEN menos virulenta induce una IMC más temprana y más corta, en cambio, en una cepa virulenta la inducción de la IMC es más fuerte y más larga. De esta manera, las cepas más virulentas persisten por más tiempo en el ave y por lo tanto son capaces de aumentar la magnitud y duración de la IMC (Rauw *et al.*, 2009).

#### 7.6.2.2 Inmunidad humoral

Después de la exposición al VEN, los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas que segregan 3 tipos de anticuerpos neutralizantes específicos al antígeno (Lambrecht *et al.*, 2004). Estos anticuerpos son necesarios para proteger a las aves de la morbilidad y mortalidad tras la infección con VENv (Reynolds y Maraqa, 2000a; Sawant *et al.*, 2011). Primero, se produce IgM y se puede detectar rápidamente a los 4 días después de la vacunación. Después de 7 días, la IgG (referido como IgY en aves debido a su diferencia estructural) e IgA, que es importante para la inmunidad local de la glándula de Harder y tonsilas cecales, pueden ser detectadas. A los 7 días postinfección el tejido esplénico está compuesto por 56% de IgM, 37% de IgY y 7% de IgA (Awad *et al.*, 2015). Asimismo, es evidente la interconexión de la IMC y la inmunidad humoral, esto se demuestra con la secreción de IL-4, la cual mejora la respuesta inmune humoral (Sawant *et al.*, 2011). Por otro lado, la inmunidad local es evaluada por la cantidad de anticuerpos de IgA antígeno específico que puede ser detectada en lágrimas, lavados traqueales y bilis después de la exposición intranasal o intraocular a vacunas vivas contra el VEN. La inmunidad local (IgA) es importante para neutralizar los viriones libres en las vías respiratorias y gastrointestinales (Russell y Ezeifeka, 1995; Ganapathy *et al.*, 2005; Perozo *et al.*, 2008).

La prueba de HI es comúnmente realizada para evaluar la respuesta de anticuerpos post vacunación porque se correlaciona bien con la prueba de virus neutralización que es más laboriosa (VN) (Thayer *et al.*, 1987). Los kits comerciales de ELISA son más accesibles y son a veces utilizados para evaluar la uniformidad de la vacunación en un lote de aves, sin embargo, porque no miden

específicamente anticuerpos neutralizantes puede que no correlacione bien con la protección (Thayer *et al.*, 1987). Los anticuerpos neutralizantes contra las glicoproteínas HN además de la F se unen a los viriones y evitan su unión a las células del hospedero, lo que reduce la replicación del virus (Taylor *et al.*, 1990; Loke *et al.*, 2005). Las vacunas vectorizadas comerciales o experimentales para VEN en general incluyen sólo la porción del gen F, que producen anticuerpos neutralizantes que no inhiben la hemaglutinación del VEN, proporcionando la posibilidad de utilizar el concepto de diferenciación entre animales infectados y vacunados (DIVA) (Taylor *et al.*, 1996; Palya *et al.*, 2012). Mientras que una glicoproteína sola puede ser protectora, también se ha demostrado una mejor protección cuando ambas glicoproteínas tanto la F como la HN están presentes (Umino *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 2009a; Kumar *et al.*, 2011).

Aproximadamente el 30% de los anticuerpos IgY y el 1% de los anticuerpos de IgM e IgA presente en el plasma de la gallina se transferirá pasivamente a la progenie y si los niveles de anticuerpos contra VEN son lo suficientemente altos pueden proporcionar protección hasta que los niveles caigan por debajo de un nivel de protección (Hamal *et al.*, 2006). Los anticuerpos maternos pueden interferir con la vacunación porque pueden neutralizar el virus vivo de la vacuna (Westbury *et al.*, 1984; Giambrone y Closser, 1990). En promedio, la cantidad de anticuerpos por HI disminuye a la mitad cada 4-5 días dependiendo de la raza del ave. En pollos de engorde, los anticuerpos maternos son detectables hasta los 7-10 días de edad (Giambrone y Closser, 1990).

Factores como el medio ambiente, nutrición, estrés, infecciones bacterianas, y los virus inmunosupresores pueden conducir a la supresión del sistema inmunitario (Gelb *et al.*, 2007; Hoerr, 2010). Si la bursa de Fabricio se ha atrofiado por el virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV), una disminución de la respuesta inmune se inducirá para cualquier vacuna. Irónicamente, las infecciones con VEN también tienen la capacidad para inmunosuprimir al hospedero y obstaculizar una respuesta inmunidad adecuada a otras vacunas, tales como al IBDV (Rautenschlein *et al.*, 2007). Mientras que el efecto en los pollos es desconocido, para los humanos tratados con VEN como tratamiento oncolítico,



frecuentemente se induce anemia inicial, leucopenia y neutropenia poco después de comenzar el tratamiento (Schirmacher y Fournier, 2009; Lam *et al.*, 2011).

## 8. Diagnóstico

Como resultado de las variaciones en la virulencia y la falta de signos clínicos característicos, generalmente es necesario, para un diagnóstico confirmatorio, que se incluya dos pasos: (i) aislamiento del virus de las aves afectadas e identificación del virus como VEN (APMV-1); y (ii) determinación del virus como EN, para distinguirlo de los virus vacunales o los virus avirulentos enzoóticos de EN, lo cual está predeterminado por estimación *in vivo* de la patogenicidad en pollos (Aldous y Alexander, 2001), definido por (1) el índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) en pollos de un día (*Gallus gallus*) de 0.7 o más; o (2) que posea múltiples aminoácidos básicos en el extremo C de la proteína F2 y una fenilalanina en el residuo 117, que es el terminal N de la proteína F1. El término "múltiples aminoácidos básicos" se refiere al menos a tres residuos de arginina o lisina entre los residuos 113 y 116. La incapacidad para demostrar el patrón característico de secuencias de aminoácidos como se describe anteriormente sería requerir la caracterización del virus aislado por la prueba IPIC (OIE, 2012).

En lo que respecta a diagnóstico, en la presente revisión se describen las principales técnicas de laboratorio usadas actualmente. Otras técnicas de laboratorio más tradicionales, como inmunodifusión en gel agar, prueba de anticuerpos fluorescentes, prueba de hemólisis (el APMV-1 causa hemólisis mientras que los virus de influenza no), o la identificación por microscopía electrónica de la morfología de las partículas víricas se pueden aplicar, pero estos métodos permiten sólo una identificación genérica de APMV sin ninguna información sobre el patotipo (Cattoli *et al.*, 2011). Adicionalmente, las técnicas inmunofluorescentes, de inmunohistoquímica y de inmunocitoquímica permiten la detección de la ubicación específica de los antígenos virales en tejidos o células (Cattoli *et al.*, 2011; Ecco *et al.*, 2011; Bwala *et al.*, 2012).

## 8.1 Aislamiento viral

Con el objeto de diagnosticar la infección por el VEN, la detección del agente infeccioso se basa en el aislamiento del virus en huevos embrionados o cultivo celular (Aldous y Alexander, 2001). En la actualidad, el aislamiento viral es la prueba prescrita para el comercio internacional (OIE, 2012) y sigue siendo el método de elección para el diagnóstico confirmatorio o *gold standard* para la validación de otras técnicas (Terregino y Capua, 2009).

### 8.1.1 Aislamiento de virus y tipificación en huevos embrionados

Como se describe en el Manual de Diagnóstico de la OIE (2012), al menos cinco huevos embrionados de aves SPF de 9–11 días de edad, para cada muestra, deben ser inoculados en la cavidad alantoidea, luego incubado a 35–37 ° C durante 4–7 días y observar diariamente para verificar su viabilidad. La mortalidad de los huevos inoculados antes de las 24 h post-inoculación generalmente se considera inespecífica, aunque algunas cepas muy virulentas si están presentes en la muestra en altas concentraciones podrían causar mortalidad embrionaria tan pronto como a las 24 horas post-inoculación. La mortalidad específica en los embriones ocurre con mayor frecuencia dentro de 3 a 5 días después de la inoculación y está influenciado por la cepa del virus, edad del embrión y concentración del inóculo. En general, la muerte embrionaria se acelera cuando los embriones son más jóvenes y se utilizan mayores concentraciones de inóculo. La muerte del embrión suele ser muy rápida si el virus se inocula en el saco vitelino y saco amniótico, mientras que es más lento si la inoculación es a través de la cavidad alantoidea (OIE, 2012).

Generalmente, más del 85% de los aislamientos de EN son hecho en el primer pasaje, siendo menos del 10% los aislamientos que necesiten un segundo pasaje. El aislamiento de VEN después de 2 pasajes es considerado muy raro (Kouwenhoven, 1993). Para acelerar el aislamiento final, es posible realizar 2 pasajes a intervalos de 3 días, obteniendo resultados comparables a 2 pasajes en intervalos de 4 a 7 días (Alexander y Senne, 2008). El líquido alantoideo, que contienen los embriones muertos, o

aquellos enfriados al final del cuarto al séptimo día, es evaluado para verificar la actividad hemaglutinante (HA), ya que la hemaglutinación es una característica clave del VEN. Sin embargo, los virus de la influenza aviar (IA) y otros paramixovirus aviares también causan hemaglutinación, por lo que la diferenciación es esencial. Si se detecta actividad HA, los agentes hemaglutinantes deben identificarse mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI), que utiliza sueros, o por medio de pruebas moleculares, que pueden proporcionar información sobre el patotipo y genotipo (Cattoli *et al.*, 2011).

En la prueba de HI, se puede observar cierto nivel de reacción cruzada entre los diversos serotipos de Paramixovirus aviar. La reacción cruzada se puede observar entre los virus AOAV-1 y AOAV-3 (particularmente con la variante de psittácidas de AOAV-3, comúnmente aislado de aves mascotas o aves exóticas) o AOAV-7. El riesgo de una tipificación equivocada de un aislamiento puede reducirse enormemente utilizando una panel de sueros de referencia o anticuerpos monoclonales (mAbs) específicos para AOAV-1, AOAV-3 y AOAV-7. El uso de mAbs también permite la caracterización de diferencias antigénicas dentro de diferentes cepas de AOAV-1 o incluso entre subpoblaciones de la misma cepa (Russell y Alexander, 1983).

## 8.2 Serología

La serología por lo general no es una herramienta útil para el diagnóstico de EN, porque los métodos serológicos actuales no pueden diferenciar anticuerpos inducidos por una infección con VENv, VENlo de aves silvestres, o aquellos inducidos por vacunación con vivas o inactivadas. Sin embargo, la serología es la más utilizada para medir la efectividad de un programa de vacunación (Wakenell *et al.*, 2016). En los países que no vacunan, la serología puede confirmar la exposición a VEN, pero pocos países están en condiciones de no vacunar. En parvadas bien manejadas que toman muestras periódicas de suero, un incremento en los títulos de HI y presencia de signos clínicos sugieren que se produjo una exposición. En este respecto, la prueba de HI y el ensayo inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) son los más utilizados comúnmente (Snyder *et al.*, 1984). Aunque la prueba de HI detecta anticuerpos

sólo para el gen HN, y el ELISA comúnmente detecta anticuerpos contra todas las proteínas del VEN, existe cierta correlación entre ambos. El ELISA es usualmente específico para la especie de hospedero porque dependen del uso de 1 anticuerpo monoclonal (mAb) contra VEN y otro mAb secundario hospedero-específico. Se debe tener precaución al usar sueros de especies distintas de los pollos en la prueba de HI porque pueden causar falso positivos (menores o iguales a 1: 8) de aglutinación inespecíficos de hematíes de pollo. Tal aglutinación se puede eliminar por adsorción con hematíes de pollo concentrados antes de la prueba (Miller y Torchetti, 2014). Cuando se usan 4 unidades HA de antígeno, los títulos superiores a 1:16 se consideran positivos. El punto de corte es mayor a 1: 8 cuando se usan 8 unidades HA (Wakenell *et al.*, 2016).

Por otro lado, la prueba de virus neutralización de (VN) es un ensayo serológico eficaz, particularmente útil para medir anticuerpos neutralizantes específicos contra VEN. La prueba se realiza mezclando suero en diluciones seriadas con una cantidad estándar de VEN (para ejemplo 100 UFP) luego los cultivos celulares de DF-1 son inoculados con las mezclas de las diluciones de virus-suero (Koch *et al.*, 1998). El título de anticuerpos neutralizantes específicos de VEN está determinado por el valor más alto de la dilución de suero que demuestre un claro efecto citopático (ECP) en el cultivo de células DF-1 después de unos cuatro días de incubación. Esta prueba es considerada la herramienta más adecuada para evaluar los títulos de anticuerpos neutralizantes después de la vacunación. Sin embargo, es muy trabajosa y lenta, debido a que los resultados se obtienen casi una semana después (Bello *et al.*, 2018).

Recientemente, se ha desarrollado de una prueba de VN mejorada (Chumbe *et al.*, 2017a) utilizando un VEN recombinante diseñado para expresar constitutivamente una proteína fluorescente verde (GFP). El ensayo ha demostrado resultados concluyentes en 24 horas sin la necesidad de cualquier procedimiento de tinción adicional. Además, su correlación con la prueba de VN convencional es mucho mayor a la correlación entre la prueba de HI o ELISA con el VN convencional. Por lo tanto, esta prueba emergente es un método rápido de cuantificación de títulos de anticuerpos neutralizantes, más apropiada para evaluar la inmunidad conferida por vacunación que para monitoreo de VEN.

### 8.3 Pruebas moleculares

El primer reporte de detección de APMV-1 por medio de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) en fluido alantoideo de huevos embrionados data de 1991 (Jestin y Jestin, 1991). Desde entonces, una variedad de protocolos de laboratorio que van desde RT-PCR a base de gel, RT-PCR en tiempo real, procedimientos basados en enzimas restricción, secuenciación rápida, técnicas de hibridización microarray, y secuenciación de nueva generación (NGS) han sido desarrolladas (Cattoli *et al.*, 2011; Deurenberg *et al.*, 2017).

El diagnóstico molecular puede dividirse esencialmente en dos categorías según el propósito del diagnóstico. Primero, la detección de EN en especies aviares y segundo la determinación de la virulencia del VEN. Para la detección de VEN, el desarrollo de una prueba en tiempo real de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RRT-PCR) capaz de detectar todos los genotipos incluso si se utilizan cebadores o primers para objetivos altamente conservados como el gen de la proteína M y L, es muy difícil. Asimismo, para la caracterización y el reconocimiento de un VENv, parte del gen F, incluida la región que codifica el sitio de escisión, es el objetivo de interés. Sin embargo, es extremadamente difícil desarrollar una prueba para detectar todos los VEN virulentos, especialmente teniendo en cuenta la variabilidad genética y variación geográfica (Hoffmann *et al.*, 2009).

Por otra parte, las técnicas moleculares han permitido que el APMV-1 sea clasificado en 2 principales grupos genéticos distintos, denominados clase I y II (Czegledi *et al.*, 2006). La clase I incluye casi exclusivamente cepas de baja virulencia recuperadas mayormente de aves acuáticas silvestres en todo el mundo, mientras que la clase II está compuesta en su mayoría de virus de alta y baja virulencia aislados de aves de corral y aves silvestres (Kim *et al.*, 2007). Además, dentro de las clases, se han identificado varios genotipos distintos en cada clase, debido a su variabilidad genética basados en el gen de la proteína F (Diel *et al.*, 2012a).

### 8.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR)

En relación a la prueba de RT-PCR, esta es la prueba molecular más utilizada en el diagnóstico de VEN, especialmente en los países en vías de desarrollo. La prueba puede detectar con rapidez y precisión el genoma viral en muestras clínicas con alta sensibilidad, especialmente si estas muestras están tomadas apropiadamente. Por lo general, la prueba está diseñada para detectar y identificar el patotipo del virus (Wang *et al.*, 2001) dirigido a una parte del gen de la proteína F que abarca el sitio de escisión, seguida del polimorfismo de longitud de fragmento de restricción utilizando BglII cuyos patrones de digestión clasifican los aislamientos de VEN en cepas lentogénicas, mesogénicas y velogénicas (Nanthakumar *et al.*, 2000). Actualmente, la patotipificación molecular del VEN se basa predominantemente en RT-PCR, seguida por el análisis de la composición de aminoácidos putativos del sitio de escisión F (De Leeuw *et al.*, 2005). Por lo tanto, la patotipificación molecular es una alternativa más conveniente a la técnica convencional de aislamiento viral que además de ser lenta necesita contención especializada (Farkas *et al.*, 2009). Sin embargo, dada la continua evolución y emergencia de nuevos genotipos del VEN (Diel *et al.*, 2012a), es necesario actualizar regularmente los cebadores utilizados en la prueba para tener en cuenta las variantes que podrían escapar en la detección como resultado de la mutación en el sitio de unión con el cebador (Miller y Koch, 2013).

### 8.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real (qPCR)

La prueba de qPCR o *quantitative* PCR no sólo es más rápida y menos engorrosa que las técnicas de diagnóstico convencionales, sino que también proporciona igual o incluso mayor sensibilidad de detección de virus que el gold estándar método de aislamiento viral. Actualmente, las pruebas qPCR basadas en el gen de la matriz (M) y el gen de fusión (F) se utilizan a menudo como métodos estándar para la detección y patotipificación del VEN directamente de muestras clínicas (Miller *et al.*, 2010).

La elección de la detección del gen M en el monitoreo de VEN es debido a la naturaleza altamente conservada en el genoma del virus. Por ello, la qPCR utilizando el gen M es capaz de detectar

la mayoría los aislamientos de VEN, especialmente los que pertenecen a la clase II (Kim *et al.*, 2007). Puesto que la mayoría de los aislamientos de clase I, no son detectados frecuentemente usando esta prueba, se ha desarrollado un ensayo llamado qPCR multiplex matriz-polimerasa, el cual utiliza una región conservada del gen de la polimerasa (L) de clase I para el diseño de cebadores y sondas. Ésta prueba no sólo detecta el VEN previamente indetectable, sino también trabaja en conjunto con la prueba del gen M bajo los mismos ajustes de temperatura (Kim *et al.*, 2008b). En consecuencia, la qPCR utilizando el gen M es una prueba rápida para la detección del VEN en muchos países (Bello *et al.*, 2018).

En relación con la patotipificación del virus, se desarrolló la qPCR basado en el gen F que diferencia los cepas de VEN lentogénicos de los virulentos (Aldous *et al.*, 2001). Aunque este ensayo fue diseñado para detectar aislamientos de VEN en los Estados Unidos, ha sido útil para detectar la mayoría de aislamientos de VEN en el mundo con excepción de unos pocos que poseen sustituciones de nucleótidos en los sitios de unión de la sonda (Terregino *et al.*, 2003). Posteriores estudios han demostrado que algunos de los aislamientos que escapan a la detección utilizando esta combinación de cebador y sonda tenían en el sitio de escisión F, un residuo de lisina (K) en la posición 114 en lugar de la glutamina (Q) convencional en esa posición. De hecho, una serie de otras diferencias de nucleótidos se observaron entre el genoma de estos virus y la sonda del gen F utilizados en esta prueba. En relación con esto último, las cepas que inicialmente escaparon a la detección utilizando la anterior prueba con el gen F, fueron todas identificadas cuando se diseñó y se probó una nueva sonda considerando la diferencia de nucleótidos anterior (Kim *et al.*, 2008a). No obstante, la qPCR está actualmente validada para la detección del VEN en muestras clínicas, es necesario monitorear continuamente la diversidad genética de los aislados de VEN para que los cebadores y sondas pueden ser actualizadas periódicamente para así identificar todas las posibles mutantes que podrían escapar a la detección (Miller y Koch, 2013).

Además de la detección de enfermedad y patotipificación, la prueba qPCR también puede utilizarse en la cuantificación de la carga viral en diferentes órganos o eliminación virus de las aves vacunadas después de un desafío con una cepa virulenta (Qiu *et al.*, 2014). Los métodos tradicionales

usados para las pruebas de eliminación de virus son las diluciones en punto final tales como la dosis infectiva media en cultivo tisular (TCID<sub>50</sub>) y la dosis infectiva media en embrión (EID<sub>50</sub>) o ensayo de placa (Hu *et al.*, 2011). Estos métodos son muy laboriosos, se llevan a cabo en varios días y requieren un gran número de huevos o múltiples placas con células para un cultivo completo. Por esta razón, las tendencias emergentes incluyen el uso de sistemas qPCR que son altamente sensibles, específicos, y confiables para la detección y cuantificación de virus en muestras clínicas en mucho menor tiempo (Bello *et al.*, 2018).

### 8.3.3 Amplificación isotérmica mediada por bucle (Técnicas de amplificación no PCR)

Recientemente, una prueba de diagnóstico simple, sensible y económica llamada amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) fue desarrollada para rápida detección del material genético de agentes infecciosos. El principio del ensayo es una reacción de desplazamiento de cadena que forma una estructura de horquilla o bucle, permitiendo una amplificación sensible y específica de la plantilla objetivo (Notomi *et al.*, 2000). La especificidad de la prueba LAMP se debe a su capacidad para detectar seis regiones independientes durante la reacción de amplificación (Njiru, 2012). El ensayo se realiza bajo condiciones isotérmicas, es decir de temperatura constante por lo que no requiere un termociclador, además necesita 4-6 cebadores, una ADN polimerasa y un baño maría (Mori y Notomi, 2009). Por lo tanto, puede ser altamente aplicable a laboratorios de diagnóstico en regiones en desarrollo donde no se disponga de equipos sofisticados. Asimismo, el producto de amplificación de LAMP puede ser detectado fácilmente a simple vista por un cambio de color. Para facilitar la visualización del resultado, tradicionalmente se agrega SYBR *green* a la mezcla LAMP antes de la incubación isotérmica (Li *et al.*, 2009). Algunos estudios han demostrado que la prueba LAMP puede detectar VEN directamente de muestras clínicas, hisopos de tráquea y cloaca, probando que su sensibilidad y especificidad son similares al de PCR anidado, pero más simple y menos costoso (Pham *et al.*, 2005). Sin embargo la prueba LAMP tiene limitaciones como las dificultades para diseñar los cuatro cebadores que se dirigen independientemente a diferentes regiones en la plantilla, así como los desafíos en LAMP multiplex



debido al mayor número de cebadores por objetivo que aumenta la probabilidad de interacciones cebador-cebador para conjuntos de objetivos múltiples (Cattoli *et al.*, 2011).

#### 8.3.4 Técnicas de hibridación de micromatriz (*Microarray hybridisation*)

A diferencia de otras pruebas moleculares, la técnica de microarray tiene el potencial de simultáneamente monitorear, detectar y caracterizar cientos a miles de objetivos sin comprometer la sensibilidad y especificidad de la prueba (Heller, 2002). Principalmente están compuestos por soportes sólidos equipados con varias sondas de ADN de identidad conocida capaces de hibridar a sus objetivos en muestras clínicas. Por lo tanto, se dice que son plataformas eficientes para patotipificación, genotipificación e identificación de biomarcadores de enfermedad (Han *et al.*, 2008). Diferentes estudios han demostrado la eficacia del sistema de hibridación de microarrays, así por ejemplo, en la detección del VEN así como del virus de IA con una detección límite tan baja como  $10^1$ - $10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml, por lo que es evidente el potencial del microarrays de ADN en la detección de infecciones mixtas (Lung *et al.*, 2012). Además, la prueba de microarray fue capaz de detectar simultáneamente diferentes patotipos del VEN, así como de virus IA H5 y H7 (Wang *et al.*, 2008). Recientemente, se ha desarrollado una técnica de diagnóstico de microarrays de suspensión luminex multiplex, para la detección simultánea de VEN, VIA, virus de la enfermedad infecciosa de la bursa y virus de bronquitis infecciosa en infecciones individuales o mixtas (Laamiri *et al.*, 2016; Sultankulova *et al.*, 2017). En tal sentido, la técnica de microarrays de ADN están entre los diagnósticos emergentes que en un futuro próximo podrían superar las técnicas convencionales de tipificación de VEN, dada su sensibilidad, especificidad y la capacidad de detectar múltiples patógenos/patotipo en muestras clínicas (Bello *et al.*, 2018).

#### 8.3.5 Diagnóstico por biosensores

Los biosensores son sistemas analíticos compuestos por moléculas de biorreconocimiento y detectores fisicoquímicos llamados transductores, capaces de convertir interacciones biomoleculares en señales medibles (Chambers *et al.*, 2008). Proporcionan una plataforma sensible y económica para la

rápida detección e identificación de agentes infecciosos. En este contexto, los biosensores sin etiqueta que proveen un medio de monitoreo continuo en tiempo real, afinidad de enlace y cinética de biomoléculas a lo largo del tiempo se encuentran entre las herramientas de diagnóstico emergentes en el siglo XXI (Sang *et al.*, 2016). Tal como es la resonancia de plasmones de superficie (SPR) que cuantifica directamente la interacción biomolecular sobre su superficie de oro inmovilizada a través de la detección de cambios en el índice de refracción. Además, los inmunosensores tienen un tiempo de detección corto y no requieren de equipo sofisticado. Contrariamente, la tecnología de biosensores debe pasar de la detección de laboratorio al diagnóstico rutinario de muestras clínicas, lo cual sigue siendo un gran desafío, posiblemente debido a los complejos tipos de material que caracterizan la muestras clínicas. Cabe destacar que la mayoría de los biosensores son altamente sensibles a factores ambientales como la temperatura y pH. Sin embargo, se están desarrollando varios enfoques para superar los efectos de los diferentes tipos de muestra (Sin *et al.*, 2014).

### 8.3.6 Secuenciación de próxima generación

La secuenciación de próxima generación o secuenciación de segunda generación o *next-generation sequencing* (NGS) es una de las herramientas recientes que ha revolucionado el diagnóstico de enfermedades infecciosas (Deurenberg *et al.*, 2017). Considerando su importancia no sólo en el seguimiento de brotes epidémicos, sino también facilitando la detección rápida, sensible y específica, además de la diferenciación de infecciones mixtas de en un mismo hospedero (Metzker, 2010). Asimismo, puede ser utilizado para detectar variantes de baja frecuencia que de otro modo no se detectarían utilizando las herramientas de diagnóstico comunes. Más aún, es la prueba de mayor rendimiento utilizada en el descubrimiento de nuevos virus asociados a enfermedades desconocidas (Deurenberg *et al.*, 2017). En consecuencia, su aplicación en el desarrollo de diagnósticos avanzados es muy bien valorada. Aún cuando, están surgiendo constantemente diferentes plataformas de NGS, todas ellas técnicamente implican tres pasos principales: preparación de la muestra, secuenciación y análisis de datos (Souf, 2016). Actualmente, la mayoría de las plataformas de NGS están orientadas al diagnóstico viral y se enfocan en mejorar las lecturas de secuencia y la velocidad de la prueba (Souf,

2016). Recientemente, la NGS se ha utilizado para la caracterización del genotipo VI de VEN en los Estados Unidos, el estudio reveló una diversidad genética previamente desconocida del virus con evidencia de su continua evolución (He *et al.*, 2018). Otro ejemplo, de la aplicación de la NGS es la caracterización simultánea de secuencias genómicas de múltiples paramixovirus aviares (Dimitrov *et al.*, 2017b). Más aún, la diferenciación de cepas virulentas de lentogénicas de clase II del VEN se logró con éxito y rápidamente utilizando NGS basado en el procedimiento de pirosecuenciación (De Battisti *et al.*, 2013). No obstante, la prueba tiene un alto costo de inversión por muestra (Souf, 2016).

### 8.3.7 Secuenciación de tercera generación

La secuenciación de tercera generación o secuenciación de lectura larga o *third-generation sequencing*, es una clase de secuenciación de ADN, que tiene la capacidad de producir lecturas sustancialmente más largas que la NGS. En los últimos años, la secuenciación de tercera generación ha mejorado enormemente, con la introducción de nuevas tecnologías como la de *Oxford Nanopore Technologies* (ONT) (Phan *et al.*, 2017), la utilidad de la secuenciación de alto rendimiento se ha incrementado en la vigilancia y caracterización de patógenos (Greninger *et al.*, 2015). Entre las grandes ventajas de la secuenciación de tecnología ONT es la capacidad de realizar análisis de secuencias en tiempo real con un tiempo de respuesta corto (Kilianski *et al.*, 2015), la portabilidad del dispositivo MinION, el bajo costo de inicio en comparación con otras plataformas de alto rendimiento, y la capacidad de secuenciar hasta varios miles de bases de moléculas individuales de ARN o ADN. El dispositivo MinION ha sido utilizado con éxito para evaluar genes de resistencia a antibióticos de varias especies bacterianas (Ashton *et al.*, 2015; Lemon *et al.*, 2017), obtener secuencias genómicas virales completas del virus de influenza (Wang *et al.*, 2015) y virus del Ébola (Quick *et al.*, 2016), y detectar parcialmente secuencias de genomas como el virus Zika (Quick *et al.*, 2017) y poxvirus (Kilianski *et al.*, 2015) mediante la secuenciación de los amplicones de PCR (AmpSeq). Recientemente, la tecnología ONT ha sido usada en el desarrollo de un protocolo efectivo para la predicción de la virulencia e identificación de genotipos del VEN utilizando el MinION (Butt *et al.*, 2018). En el mismo estudio, la prueba fue capaz de detectar el virus de muestras de campo, lo que demostraría su viabilidad en el diagnóstico clínico, aunque es necesaria una evaluación más extensa de la sensibilidad y especificidad

en muestras de campo, es posible una mejor optimización de esta tecnología que con otras técnicas (Butt *et al.*, 2018). Por lo tanto, el dispositivo MinION, representa un gran avance en el diagnóstico de enfermedades infecciosas para la realización de una identificación rápida y caracterización genómica de agentes infecciosos a un menor costo (Butt *et al.*, 2018).

## **9. Estrategias de prevención y control**

En relación al control de la EN es necesario considerar como estrategias la vacunación y la bioseguridad. Por una parte, la bioseguridad es un componente crítico e imprescindible para mantener al lote alejado de desafíos de campo con agentes infecciosos, como en el caso de la EN, sobretodo es muy importante antes que las aves alcancen un nivel protector de inmunidad vacunal, o idealmente prevenir cualquier exposición (Mayers *et al.*, 2017). Por otra parte, la vacunación tiene como objetivos disminuir o eliminar la enfermedad clínica; disminuir la cantidad de virus virulento secretado, es decir, la carga viral que es eliminada al ambiente a través de las heces o secreciones orales o oculonasales en las aves infectadas con VEN; y aumentar la dosis infecciosa del virus de desafío para que ocurra la enfermedad. En contraposición, no todas estas premisas son consideradas como meta por los veterinarios de campo, siendo sólo disminuir o eliminar la enfermedad clínica tomado en cuenta, ya que en granjas no hay acceso a las herramientas para evaluar la eficacia de la vacunación para los otros objetivos (Kapczynski *et al.*, 2013).

### **9.1 Bioseguridad**

La bioseguridad tiene un rol crucial en la prevención de la introducción y diseminación del VEN y otras enfermedades aviares. Las medidas de control adoptadas por los productores avícolas a gran escala son similares para todos los agentes patógenos, en especial los virus, por lo tanto, el desarrollo e implementación de procedimientos para reducir el riesgo de introducción y/o transmisión de agentes infecciosos a lotes susceptibles son los principios más importantes para el control de enfermedades. Los

componentes principales de la bioseguridad en la avicultura incluyen la protección de los galpones, y de los equipos para agua y alimento de las aves para prevenir el acceso de las aves silvestres, cuarentena de aves nuevas separadas de las aves de la crianza regular, mantener la fuente y almacenamiento del alimento libres de contaminación con heces de aves silvestres, limpieza y desinfección de las instalaciones (y cualquier equipo usado en el mismo) antes de la repoblación, y la adherencia a estrictos en el sitio protocolos que eviten que el personal introduzca o transmita enfermedades entre galpones (Alders, 2014). El proceso de desinfección es un factor muy importante antes de la introducción de un nuevo lote de aves, teniendo en cuenta que los productos usados deben ser autorizados, así como el tiempo de contacto en el cual los virus están expuestos al desinfectante, para asegurar suficiente inactivación (Kinde *et al.*, 2004); asimismo, en conjunto con constante saneamiento de calzado, equipo y vestimenta.

Otro aspecto son las aves silvestres, las cuales son un riesgo significativo para las aves domésticas, debido a que son portadoras de enfermedades aviares que pueden tener enormes implicancias económicas para la producción avícola. Igualmente, la protección de los galpones para impedir la entrada de aves silvestres o sus deyecciones, especialmente los de la familia Columbiforme, es esencial para controlar la propagación de EN, puesto que las palomas son infectadas con una variante paloma de APMV -1 conocida como paramixovirus de paloma que se ha demostrado que es la causa de muchos brotes de VEN en todo el mundo (Aldous *et al.*, 2003; Alexander *et al.*, 1985).

En relación con las medidas de bioseguridad, el hombre representa un riesgo crítico, por esta razón el personal que ingresa a la granja debe representar un riesgo mínimo, siendo necesario que la vestimenta y los zapatos sean de uso exclusivo para la instalación (CDFA, 2016), en particular los zapatos, que representa un fomite con alto riesgo de introducción de patógenos (Hauck, *et al.*, 2016). Además, el personal visitante necesario como los veterinarios o grupos de vacunación o saca no deben haber tenido contacto previo con aves de ningún tipo durante las últimas 72 horas. El control de vectores biológicos como plagas de roedores o moscas es muy importante, se recomienda un control y monitoreo semanal para establecer el riesgo de enfermedad al mínimo (CDFA, 2016).

Por consiguiente, implementar un enfoque multifacético que involucre protocolos estrictos de gestión combinando el uso de cuarentena, prácticas estrictas y meticulosas de higiene junto a la vacunación proporcionan una adecuada prevención de enfermedades y programa de control. Por último, en caso de un brote de EN, la instalación avícola infectada debe someterse a estrictas medidas de control, que incluyen despoblación, restricciones al movimiento de aves y productos asociados, además de protocolos de limpieza y desinfección rigurosos. Estas restricciones tienen un impacto económico importante para el avicultor, por lo tanto, es primordial que el diagnóstico diferencial sea lo más rápido posible, para distinguir si se trata de un VEN velogénico o un virus vacunal lentogénico u otros virus respiratorios. Sin embargo, la vacunación contra EN en un lote aviar susceptible también puede contribuir a las medidas de bioseguridad establecidas, aumentando la resistencia a la infección, al requerir la exposición una dosis infecciosa mayor de virus en caso de quiebre de bioseguridad (Mayers *et al.*, 2017).

## 9.2 Vacunación

Como se mencionó anteriormente inclusive en caso de una bioseguridad estricta, la vacunación sigue siendo necesaria para proteger de manera óptima a las aves contra las enfermedades de importancia económica como la EN. Por lo tanto, un programa eficaz para el control de enfermedades avícolas exige una combinación de estrictas medidas de bioseguridad y un plan de vacunación (Mayers *et al.*, 2017). Por un lado, el éxito de un programa de vacunación contra VEN depende de que las aves reciban una dosis adecuada y respondan eficientemente a la vacunación para lograr la inmunidad del lote. Por otro lado, otros factores podrían influir en el desarrollo de la inmunidad como deficiencia nutricional, estrés, supresión inmune y desafíos repetidos, sin embargo, estos varían dependiendo de la situación epidemiológica específica de EN en cada región (Van Boven *et al.*, 2008). En cuanto a las estrategias para la vacunación contra EN, éstas son ampliamente clasificadas en dos: los métodos convencionales desarrollados en la década de 1940, así como los recientemente métodos emergentes basados en tecnología de ADN recombinante (Bello *et al.*, 2018).

## 9.2.1 Vacunas convencionales

### 9.2.1.1 Vacunas vivas

Las vacunas vivas son las vacunas tradicionales más comúnmente usadas. Las cepas vacunales más usadas son lentogénicas y pertenecen al genotipo II de clase II, las cuales son LaSota, Hitchner B1, VG/GA y Fuller (F). Todos estos virus están altamente relacionados entre sí genéticamente y antigénicamente (> 98% de identidad de nucleótidos). Un segundo grupo de vacunas vivas que se usan ampliamente, en regiones de Asia y África, son las cepas vacunales del genotipo I de clase II, es decir, las cepas I-2, V4 y PHY-LMV42, que son avirulentas y se utilizan con seguridad en pollos de todas las edades. Las diferencias principales entre estas vacunas son el tropismo y la capacidad de replicarse en los pollos sin desafío previo, la cual es más alta en la cepa LaSota, principalmente respirotópica, y resulta en una inmunogenicidad superior en comparación con otras cepas (Meulemans, 1988). Por lo tanto, la cepa LaSota casi siempre se usa en países donde el VENv es endémico (Diel *et al.*, 2012b). En cuanto a la cepa B1, no es tan inmunogénica como LaSota, pero es reconocida por ser bastante atenuada, con cero reacciones respiratorias posvacunales para usar en casos de desafíos bajos o en aves muy jóvenes. Por otra parte, la cepa VG/GA es una vacuna enterotópica que estimula la inmunidad mucosal intestinal.

Las cepas de VEN que tienen mayor estabilidad al calor son especialmente ventajosas en las zonas rurales del mundo con refrigeración limitada. Es así como la cepa I-2 ha mejorado la termoestabilidad en comparación con la cepa V4 de la que se derivó, ambas se utilizan principalmente en áreas con temperaturas ambientales más altas (Alders, 2014). Estas vacunas también son efectivas para prevenir los signos clínicos después de la infección con un VENv, pero no previenen la replicación viral (Susta *et al.*, 2015). Por otro lado, las cepas mesogénicas de VEN que son usadas como vacunas vivas son las cepas Mukteswar y Komorav, las cuales se utilizan como vacunas booster después de una primovacunación con cepas lentogénicas en India y países de Africa, no obstante, estas vacunas pueden

predisponer a reacciones posvacunales muy fuertes e infección virales o bacterianas secundarias (Senne *et al.*, 2004; Dimitrov *et al.*, 2017a).

Mientras que las vacunas vivas proporcionan inmunidad tanto mucosal como humoral y pueden administrarse usando técnicas de aplicación masiva, pueden causar enfermedad respiratoria clínica, disminución de la producción de huevos y son fácilmente inactivadas cuando no se mantienen a la temperatura requerida (comúnmente 4 C°) (Winterfield y Dhillon, 1981). La efectividad de las vacunas contra VEN está directamente correlacionada con la dosis de la vacuna administrada, y en condiciones experimentales, la media de la dosis infectiva embrionaria de la vacuna (DIE<sub>50</sub>) de 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> alcanza confiablemente una protección del 100% contra la mortalidad en pollos libres de patógenos específicos (SPF) adultos, aunque no previene la replicación del virus de desafío y la eliminación viral del mismo (Cornax *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2013; Cardenas-Garcia *et al.*, 2015). Más aún, se ha demostrado que a una dosis mayor (LaSota de 10<sup>6</sup> DIE<sub>50</sub> o superior), la replicación y la eliminación viral fue sustancialmente reducida (Cornax *et al.*, 2012). En consecuencia, estos resultados parecen confirmar los resultados en el campo en el que una estrategia de vacunación más agresiva a menudo resulta en un mejor control de EN (Dimitrov *et al.*, 2017a).

Sobre la base de que las vacunas vivas son idóneas para la aplicación masiva a través de agua de bebida o aspersión a las aves, representa una gran ventaja, lo que reduce su costo total desde su manufactura a dosificación, por lo cual es altamente económica (De Geus *et al.*, 2012). Asimismo, el virus vacunal en las aves vacunadas puede diseminarse a las aves que fueron vacunadas subóptimamente y que están próximas, de esta manera, contribuyendo a la inmunidad general del lote (Thornton *et al.*, 1980). Sin embargo, las vacunas vivas tienen algunas desventajas, como tener el potencial de revertir a la virulencia y causar enfermedad clínica en el lote vacunado. Además, dependiendo de la cepa vacunal utilizada, y las condiciones medioambientales del galpón, es decir, deficiente ventilación, exceso de polvo y temperatura, éstas pueden inducir reacciones respiratorias posvacunación en aves jóvenes que, si son graves, podrían predisponer a infecciones bacterianas secundarias (Winterfield *et al.*, 1980). Al mismo tiempo, las vacunas se basan en gran medida en genotipos I o II cepas que son filogenéticamente



divergentes de los genotipos prevalentes en los brotes actuales en diferentes países. Por consiguiente, aunque las vacunas todavía confieren protección contra los signos clínicos y la mortalidad causada por cualquier VEN, su incapacidad para bloquear la eliminación del virus posdesafío mantiene la presencia continua de virus virulentos en el medio ambiente. Por esta razón, teniendo en consideración estas limitaciones, es requerido que nuevas vacunas de vanguardia superen las debilidades de las vacunas vivas convencionales (Bello *et al.*, 2018).

#### 9.2.1.2 Vacunas inactivadas

La inmunización del ave con vacunas inactivadas es la estrategia temprana para el control de la enfermedad de Newcastle. Las vacunas se producen mediante el cultivo de cualquier cepa de VEN de interés hasta obtener altas concentraciones del virus, seguido de su inactivación mediante el uso físico o métodos químicos (Tlaxca *et al.*, 2015). Dado que las glicoproteínas de la superficie viral (F y HN) son los determinantes más importantes de anticuerpos neutralizantes, los métodos utilizados en la inactivación viral deben conservar estos epítomos inmunogénicos de las proteínas de superficie. Entre los productos químicos más utilizados para la inactivación se encuentran la etilenimina binaria (BEI) y el formaldehído (Reddy y Srinivasan, 1991; Sadigh-Eteghad *et al.*, 2012).

Las vacunas se preparan normalmente en emulsiones de aceite mineral (agua en aceite). Generalmente se requiere que la relación de la fase acuosa a la fase oleosa logre un equilibrio entre la estabilidad de la vacuna y su viscosidad, de modo que la vacuna permanezca estable y, no sea difícil de administrar debido a la alta viscosidad de la emulsión (Fukanoki *et al.*, 2001). Debido a que estas vacunas no pueden replicarse y diseminarse horizontalmente entre las aves vacunadas, no se pueden aplicar para aplicación masiva, por lo que requieren administración individual mediante inyección subcutánea o intramuscular. Sin embargo, la cualidad de no replicarse hace que sea segura y sin riesgo de reversión a la virulencia (Zhai *et al.*, 2011). Por lo tanto, los procesos de fabricación de estas vacunas deben ser óptimos, en referencia a que un exceso en la inactivación puede destruir los epítomos inmunogénicos y una exposición leve al químico o irradiación puede no ser suficiente para inactivar el virus (OIE, 2012). Adicionalmente, para obtener mejores resultados, las vacunas inactivadas se

administran después de la primera vacunación con vacunas vivas y pueden requerir adyuvantes para ayudar en la adaptación de la respuesta inmune al epítipo inmunodominante (Zhai *et al.*, 2011).

No obstante, los adyuvantes también pueden ocasionar algunas reacciones indeseables en las aves vacunadas. Una de las desventajas de las vacunas inactivadas es el requisito de un período de retiro antes que las aves inmunizadas puedan ser procesadas para el consumo humano (Kapczynski *et al.*, 2013). Además, las vacunas de EN inactivadas son generalmente deficientes inductores de la respuesta inmune mediada por células y de mucosas (Zhai *et al.*, 2011). Asimismo, eliminan mayores cantidades de virus virulento de desafío en comparación con las aves vacunadas con vacunas vivas (Miller *et al.*, 2013, 2009). Aunque las aves con vacunas inactivadas tienden a tener niveles de anticuerpos humorales más altos (Schijns *et al.*, 2013).

## 9.2.2 Tecnologías de vacunas recombinantes

### 9.2.2.1 Vacunas ADN

Avances en la tecnología del ADN recombinante han hecho posible el desarrollo de las vacunas de ADN mediante la clonación de un gen que codifica un inmunógeno o un grupo de epítopos neutralizantes en un plásmido de expresión. Cuando el plásmido recombinante es administrado en el hospedero animal, el gen clonado puede ser transcrito y luego traducirse a proteínas, las cuales, cuando son procesadas por las células hospederas, pueden servir como potentes epítopos capaces de inducir una respuesta inmune protectora (Doria-Rose y Haigwood, 2003). En un estudio reciente, el gen F completo de VEN fue clonado en un plásmido de expresión pIRES y usado como vacuna ADN en pollos, observándose luego, un alto título de anticuerpos. Adicionalmente, cuando se usó un plásmido que codifica las proteínas F y HN como primera vacuna en pollos y luego un refuerzo con una vacuna inactivada, se registró un aumento marcado de la inmunidad humoral protectora (Firouzmandi *et al.*, 2016a), lo que indica que las vacunas ADN pueden ser utilizadas para mejorar la eficacia de las vacunas inactivadas.

La efectividad de las vacunas ADN se puede mejorar aún más cuando se usa un vehículo como las nanopartículas para administrar la vacuna. Un ejemplo, es el uso de la nanopartícula de dextrano-espermina para encapsular una vacuna ADN codificando las proteínas F y HN de VEN (Firouzmandi *et al.*, 2016b). Otro ejemplo, es la encapsulación de la vacuna ADN, que codifica el gen F, con nanopartículas de quitosano o chitosán, las cuales favorecieron una mejor respuesta inmune humoral, celular y mucosal (Zhao *et al.*, 2014). En tal sentido, la vacuna basada en ADN puede ser una alternativa segura contra los retos actuales de EN. La mayor ventaja de la vacuna ADN es su seguridad, además de la capacidad de inducir respuesta inmune celular expresando CD4+ y CD8+. Sin embargo, sus limitaciones incluyen una pobre inmunogenicidad, alto costo de producción, y su inconveniencia para la administración masiva. Igualmente, necesitan de un vehículo de entrega para su administración debido a que son fácilmente degradadas por las nucleasas antes de que alcancen su final destino. No obstante, el uso de adyuvantes y vehículos de entrega pueden superar algunas de estas limitaciones (Zhao *et al.*, 2018).

#### 9.2.2.2 Vacunas de vectores virales

En cuanto a las vacunas recombinantes, son una estrategia disponible en el mercado de vacunas contra EN, éstas vacunas utilizan otros virus aviares como vectores. Los vectores aviares más usados son el virus de la viruela aviar (VVA) y el herpesvirus del pavo (HVT). Debido a su genoma ADN de doble cadena, estos virus tienen una alta capacidad de expresar genes foráneos. Además son altamente inmunogénicos, capaces de inducir una respuesta inmune innata fuerte vía la activación de TLR (Meulemans *et al.*, 1988). En 1990, se demostró que las vacunas en vector VVA que expresan la proteína F o HN del VEN protegen a los pollos contra un desafío con VENv (Boursnell *et al.*, 1990). Al menos dos vacunas comerciales de VVA recombinantes (VVA<sub>r</sub>) contra EN se han registrado y se venden comercialmente. Sin embargo, las vacunas VVA<sub>r</sub>-EN no se usan ampliamente porque no se pueden aplicar mediante métodos masivos de vacunación. Además, la exposición previa al VVA, que

comúnmente está presente en el ambiente, disminuye la eficacia de las vacunas de VVAr (Dimitrov *et al.*, 2017a).

El herpesvirus del pavo (HVT) o serotipo 3 del virus de la enfermedad de Marek, es uno de los vectores más ampliamente utilizados en la producción de vacunas recombinantes. A principios de la década de 1990, se demostró la eficacia protectora de las vacunas basadas en vectores HVT para proteger a los pollos contra EN y la enfermedad de Marek (Morgan *et al.*, 1992). Estas vacunas se hacen insertando la región codificante de la proteína de fusión de VEN en el sitio de la timidina quinasa del genoma viral, y son capaces de expresar la proteína codificada por el gen durante la replicación. Actualmente, se han registrado dos vacunas bivalentes comerciales recombinantes de HVT (HVTr) contra IBD y EN (Dimitrov *et al.*, 2017a).

Mientras que la replicación de las vacunas con HVTr-EN parece estar levemente obstaculizada por la presencia de anticuerpos maternos (Le Gros *et al.*, 2009), pueden prevenir la enfermedad clínica y la mortalidad cuando se les desafía con un VENv seis semanas después de la vacunación (Sonoda *et al.*, 2000). Los anticuerpos inducidos después de la administración de las vacunas HVTr-EN ocurren al mismo tiempo en que disminuyen los anticuerpos maternos. Asimismo, las vacunas HVTr-EN pueden administrarse in ovo en la incubadora o subcutáneamente después de la eclosión y producir inmunidad a largo plazo (Esaki *et al.*, 2013). Sin embargo, la vacuna HVTr-EN está asociada a células, por lo que, al igual que las vacunas contra la enfermedad de Marek, se las debe mantener en nitrógeno líquido y administrarse hasta una hora después de descongelarse. Por otro lado, HVTr-EN requiere de cuatro semanas para que alcance la inmunidad total (Palya *et al.*, 2012), por lo que es requerido un nivel más estricto de bioseguridad para prevenir la infección durante ese período. Por esta razón en países endémicos, con desafíos constantes de EN debe tenerse otras consideraciones al momento de usar estas vacunas.

Las vacunas HVTr-EN se han usado ampliamente en países donde existen desafíos mínimos de virus; sin embargo, en los países endémicos, es posible que estas vacunas deban usarse en combinación

con otras vacunas de EN para conferir una protección aceptable. Después de la eclosión, la administración de una vacuna de EN inactivada o viva a las aves que fueron vacunadas in ovo con la vacuna HVTr-EN, aumenta el nivel de inmunidad para facilitar una protección más completa y ayuda a disminuir la cantidad VEN virulento eliminado después del desafío (Palya *et al.*, 2014). Este enfoque se conoce comúnmente como una estrategia prime-boost. Por otra parte, la respuesta inmune a la vacuna HVTr-EN no puede ser medida por una prueba serológica simple que detecte anticuerpos contra la proteína F. Por esta razón, se ha desarrollado una prueba qPCR para evaluar la carga de la vacuna HVTr-EN de los folículos de las plumas (Rauw *et al.*, 2015), este enfoque puede ser útil para evaluar si la aplicación de la vacuna fue exitosa. Recientemente, se ha desarrollado un kit comercial de ELISA (BioCheck®) para detectar anticuerpos anti-VEN inducidos por vacunas HVTr-EN (Dimitrov *et al.*, 2017a).

Es importante tener en cuenta que el uso de una vacuna HVTr in ovo evita el uso de otras vacunas vectorizadas con HVTr subcutáneamente en las mismas aves después de la eclosión, ya que la inmunidad inducida por la primera vacuna neutralizará los virus de la segunda aplicación después que se administra (Esaki *et al.*, 2013). Sin embargo, la administración subcutánea simultánea de una vacuna del virus de la enfermedad de Marek recombinante del serotipo 1 (cepa Rispens) que expresa la proteína codificada por el gen VP2 del virus IBD con una vacuna HVTr-EN resultó en 94%, 100% y 94% de supervivencia después del desafío (cinco semanas después de la vacunación) con el virus de la enfermedad de Marek, virus IBD y VEN, respectivamente (Ishihara *et al.*, 2016). De este modo la aplicación de ambos vectores de serotipo 1 de enfermedad de Marek y HVTr es compatible y confieren protección (Ishihara *et al.*, 2016).

Por lo que se refiere al uso del VEN como vector. Se han creado muchas vacunas recombinantes de EN mediante la inserción de un gen foráneo en una región intergénica del genoma del VEN para la expresión y el uso dual como una vacuna contra el VEN y el segundo agente. Al respecto, se han desarrollado varias vacunas usando vectores de VEN conteniendo diferentes genes de hemaglutinina (HA) de virus Influenza aviar (VIA), debido a la creciente necesidad de una mejor protección de la

industria avícola contra la IA de alta y baja patogenicidad (Lardinois *et al.*, 2012; Goff *et al.*, 2013). En los últimos años, con los múltiples brotes de IA en China, las vacunas VEN-VIAr son muy utilizadas en las granjas en esta región, con aproximadamente 11.7 billones de dosis aplicadas desde 2006 hasta 2012 (Li *et al.*, 2014). Por otro lado, en México, también ha utilizado una vacuna similar durante el brote del 2008, donde se administraron 32 millones de dosis de VEN-VIAr (Villarreal, 2009).

#### 9.2.2.3 Vacunas homólogas basadas en genética reversa

Las vacunas vivas e inactivadas de EN homólogas antigénicamente han sido desarrolladas utilizando la genética reversa, que es la recuperación de un virus recombinante de su clon de ADNc (Pfaller *et al.*, 2015a). Existen dos tipos de esta clase de vacunas. El primer tipo es manufacturado con un virus que es idéntico al virus virulento prevalente en el campo con la excepción del sitio de escisión de la proteína de fusión, que es modificado de polibásico a monobásico para disminuir la virulencia (Bello *et al.*, 2018). El segundo tipo de vacunas, es desarrollado usando un virus vacunal como armazón, por ejemplo LaSota, en el cual los genes de la proteína de fusión y hemaglutinina neuraminidasa son reemplazados con sus pares homólogos a los virus circulantes. Es decir, el sitio de escisión de la proteína F del virus virulento es modificado y diseñado para ser idéntico al sitio de escisión de la cepa vacunal LaSota (Dimitrov *et al.*, 2017a).

Asimismo, al vacunar aves con vacunas homólogas de EN vivas e inactivadas, se produjo una mayor respuesta inmune humoral a los virus de desafío que con la vacuna heteróloga, además la cantidad de virus de desafío que se eliminó de estas aves fue inferior a la cantidad secretada por las aves con la vacuna heteróloga (Miller *et al.*, 2007, 2009a). En un estudio se determinó que la eficacia de las vacunas inactivadas de genotipos I, II, V, VI, VII y XII contra virus de desafío de diferentes genotipos bajo óptimas condiciones, evita la morbilidad y mortalidad en 90 a 100% de las aves frente a todos los VENv sin importar su genotipo (Miller *et al.*, 2007, 2009a 2013). Sin embargo, cuando una vacuna heteróloga (de genotipos no coincidentes) viva o inactivada contra EN se administró adecuadamente y los pollos tuvieron suficiente tiempo para desarrollar una respuesta inmune adecuada, todas las aves vivieron y no mostraron signos de enfermedad (Cornax *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2013), sustentando la afirmación de

que la aplicación de la dosis adecuada de vacuna también es crucial para el control de EN (Dortmans *et al.*, 2012).

Más recientemente, las vacunas recombinantes con genes de proteínas F y HN, homólogas al virus circulante en un armazón de LaSota, han demostrado que inducen niveles más altos de anticuerpos, y reducen la eliminación viral después del desafío en comparación con la vacuna comercial LaSota. Además, cuando las aves fueron vacunados subóptimamente con dosis baja administradas a sólo siete días antes del desafío con un VENv, una disminución del porcentaje de morbilidad y mortalidad fue observada con una vacuna homóloga en comparación con la vacuna heteróloga tradicional (Cardenas-Garcia *et al.*, 2015). Otros estudios realizados (Cho *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015) han tenido hallazgos similares en términos de reducción de la eliminación viral, mientras que otros no encontraron diferencia en el uso con sus vacunas homólogas contra la EN (Dortmans *et al.*, 2012).

La mayor ventaja de las vacunas homólogas por genética reversa en comparación a las vacunas tradicionales es la disminución en la cantidad de virus de desafío eliminado de los pollos vacunados (Xiao *et al.*, 2012). Los resultados de protección obtenidos bajo condiciones experimentales en aves vacunadas subóptimamente sugieren que las ventajas de estas vacunas pueden ser más notorias en el campo (Kim *et al.*, 2017). Un ejemplo del uso de las vacunas homólogas en condiciones de campo se encuentra en México, donde se ha usado ampliamente la vacunación homóloga al genotipo V de VEN (Dimitrov *et al.*, 2017a), lo que indica una puesta en valor de los beneficios de una reducción en la propagación viral. No obstante, la manipulación de VEN virulentos representaría un riesgo, necesitando altos niveles de bioseguridad para la manufacturación de las vacunas homólogas en el laboratorio.

Adicionalmente, la mayoría de los países no disponen de laboratorios de vacunas con el nivel de bioseguridad requerido para la producción segura de vacunas homologas (Dimitrov *et al.*, 2017a). En la actualidad, las vacunas basadas en genética reversa son demasiado caras de desarrollar, sin embargo, cada vez la industria de síntesis de genes está más disponible lo que hace probable que el costo de estas vacunas se reduzca drásticamente en el futuro cercano. En definitiva, la proliferación de estas vacunas

en diferentes países se anticipa fuertemente debido a sus características únicas, como la eficacia protectora, estabilidad genética y homología con el VEN prevalente (Bello *et al.*, 2018).

#### 9.2.2.4 Partículas similares a virus

Las partículas similares a virus (VLPs) son proteínas estructurales de virus sin genoma ensamblado compuesto por estructuras superficiales repetitivas que sirven como patrones moleculares asociados a patógenos capaces de inducir una respuesta inmune robusta (Kushnir *et al.*, 2012). Los VLPs son morfológicamente muy similares a los virus pero no se pueden replicar, haciendo que los VLPs sean una plataforma de vacuna altamente segura (Mohsen *et al.*, 2017). Un ejemplo de este tipo de vacunas contra EN se logró expresando la proteína M en combinación con el NP y las glicoproteínas de superficie viral F y HN (Pantua *et al.*, 2006). Otro ejemplo, es la coexpresión de la proteína F del VEN y la proteína M1 del VIA efectivamente producida en VLPs en el sistema de expresión de baculovirus (Park *et al.*, 2014).

Además, los VLPs aparte de incorporar con éxito las glicoproteínas de superficie, también logra conservar la conformación estructural de las proteínas y las funciones biológicas tales como fusogenicidad, hemaglutinación y neuraminidasa. Asimismo, la inmunización de pollos con vacunas VLPs contra EN induce una fuerte respuesta inmune similar a la vacuna inactivada (McGinnes *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2014).

Hay que destacar varias características únicas que diferencian los VLPs de EN de muchos otros sistemas VLP. Primeramente, la relación de las proteínas en los VLPs es muy similar al virus de campo. En segundo lugar, a diferencia de otros VLPs que son liberados de la célula con eficiencias de 10- 50%, los VLPs de EN demuestran ser liberados de las células aviares con una eficiencia del 84% (Pantua *et al.*, 2006), es decir, tienen una alta eficiencia de liberación muy similar a viriones auténticos.



Además, los VLPs de EN se pueden concentrar y purificar fácilmente utilizando los protocolos estándar para purificación de virus. Por el contrario, producir una gran cantidad de VLPs para una prueba de vacunación masiva puede resultar complicado, especialmente si se utilizan otras plataformas que no sean sistemas de expresión de baculovirus. Además, como las VLPs no pueden replicarse en las aves vacunadas, necesitan ser administradas individualmente, en grandes cantidades y con adyuvantes para lograr una respuesta inmune efectiva contra la EN (Morrison, 2010). A pesar de estas desventajas, los VLP son una plataforma segura de vacunas cada vez más popular en el control de VEN (Bello *et al.*, 2018).

### 9.3 Métodos de vacunación

La inmunidad en la población de una granja es importante para prevenir la diseminación de la enfermedad cuando hay un desafío por VEN. En condiciones experimentales, se ha determinado que la protección de un lote después de la vacunación puede ser lograda si hay seroconversión de al menos el 85% de aves con títulos en  $\log_2 \geq 3$  contra VEN mediante inhibición de la hemaglutinación (Van Boven *et al.*, 2008). Sin embargo, esto puede variar en el campo, debido a variables como el estrés, condiciones de manejo, inmunosupresión o fallas en la vacunación (Dimitrov *et al.*, 2017a), por lo que las vacunaciones en campo en nuestro medio deben tener una uniformidad de 99-100 % de las aves para proteger contra la enfermedad (M. Alba, Lima, comunicación personal). En relación con los procedimientos de vacunación de las vacunas aviares contra EN, estos varían según el tipo de vacuna. En general, las vacunas vivas pueden ser aplicadas con métodos de vacunación masiva como la aspersión con gota gruesa y la vacunación vía agua de bebida, e individuales como gota nasal o intraocular. Mientras que las vacunas inactivadas pueden ser aplicadas sólo individualmente mediante inyección intramuscular o subcutánea. Por otro lado, las vacunas vectorizadas pueden ser aplicadas mediante inyección in ovo o inyección subcutánea en la planta de incubación (Collett, 2013).

### 9.4 Programas de vacunación utilizados en Perú

Los programas usados en nuestro país consisten en su mayor parte de programas de vacunas vivas e inactivadas. En pollos de engorde, la mayoría de los programas de vacunación recomiendan al menos dos dosis de vacunaviva contra VEN, una en planta de incubación y un refuerzo en granja. La primera dosis puede empezar lo más temprano posible en planta de incubación con la vacuna *in ovo*, o al nacimiento usando la vacuna vectorizada en HVT-ND o HVT IBD-ND (Absalón *et al.*, 2019). Además, al primer día de edad se pueden usar vacunas vivas con cepas apatógenas como la cepa B1, PHY-LMV42 o VG/GA, sin ocasionar interferencia con la protección vacunal de bronquitis infecciosa o metapneumovirus aviar (Palomino *et al.*, 2011). La segunda dosis de refuerzo en granja se aplica entre los 10 y 14 días de edad, con cepa LaSota o con cepa VG/GA. Asimismo, las vacunas inactivadas inducen una mayor respuesta humoral y son formuladas en adyuvante de aceite o en gel de absorción lenta (E. Icochea, Lima, comunicación personal). La inclusión de una vacuna inactivada en un programa con vacunas entéricas mejora la protección frente a un desafío con VEN virulento (Chávez, 2014).

En el caso de pollos de engorde, estas vacunas pueden ser aplicadas junto con la vacuna viva o sola al primer día de edad, así también pueden aplicarse junto con la vacuna viva en granja entre los 10 a 14 días de edad. Respecto a las aves de producción de vida larga como reproductoras o gallinas de postura, estas reciben al menos dos vacunas inactivadas a las 3 y 15 semanas aproximadamente y tres vacunas vivas durante la etapa de levante a las 2, 8 y 11 semanas de edad vía agua de bebida, gota ocular o aspersión con gota gruesa. Adicionalmente, en el caso de las gallinas de postura, las vacunas de refuerzo pueden ser aplicadas en la etapa de producción cada 4 semanas a partir de las 25 o 28 semanas de vida (E. Icochea, Lima, comunicación personal).

## **10. VEN y su uso en medicina humana**

El VEN ha surgido como uno de los virus oncolíticos más importantes a finales del siglo XX (Elankumaran, 2013). El efecto oncolítico del VEN fue observado por primera vez por Cassel y Garrett en el año 1965 (Cassel y Garrett, 1965). Posteriormente, el VEN ha sido ampliamente utilizado como

un agente biológico oncolítico por su capacidad de replicarse mejor en células humanas cancerosas que en células humanas normales (Schirmacher *et al.*, 2001). El VEN infecta y mata preferentemente las células tumorales mediante apoptosis (Alexander, 2000a; Elankumaran *et al.*, 2006) muy similar a otros virus de ARN como el virus del sarampión (Pfaller *et al.*, 2015b).

Los VEN mesogénicos y velogénicos poseen potentes propiedades oncolíticas mediante las cuales infectan, replican y matan eficientemente células tumorales, no afectando las células normales (Schirmacher y Fournier, 2009). Probablemente, la susceptibilidad de las células tumorales al VEN pueda deberse a los cambios que surgen durante la oncogénesis, que incluye defectos en las vías del interferón del hospedero que dan como resultado una respuesta antiviral ineficiente y un aumento concomitante en la susceptibilidad a la infección viral (Stojdl *et al.*, 2003). Asimismo, la propiedad oncolítica del VEN se deriva de su capacidad para crecer en células deficientes en interferón (IFN) tales como células tumorales que son defectuosas en este mecanismo de defensa (Stojdl *et al.*, 2000).

Algunas de las cepas de VEN usadas extensamente en el tratamiento de cáncer en humanos son PV701, 73-T, MTH-68 y Ulster. La manipulación genética del VEN mediante la tecnología de genética reversa ha creado VEN recombinantes con genes que expresan proteínas inmunoestimuladoras tales como citoquinas como IL-2, IL-7, IFNs, anticuerpos de Ig G, o moléculas antitumorales, que ayudarían a mejorar la propiedad oncolítica específica del VEN (Lam *et al.*, 2011; Biswas *et al.*, 2012; Shobana *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2016).

Por último, las investigaciones del VEN en el campo de la salud humana, con respecto a las mutaciones de los genes de las proteínas F y HN y su expresión sobre la relación y balance de estas proteínas en la infección del VEN (Rangaswamy *et al.*, 2017), contribuyen a dar más información sobre su patogenicidad.

### III. DISCUSIÓN

La enfermedad de Newcastle (EN) genera grandes pérdidas económicas y representa una amenaza para la industria avícola en todo el mundo. A pesar que la implementación de programas de vacunación constantes en países donde la EN es endémica, la enfermedad frecuentemente se sigue detectando aún en lotes vacunados (Cattoli *et al.*, 2011). Mientras tanto, los países libres de enfermedad son propensos a los brotes accidentales causados por tráfico ilegal de aves o subproductos, y aves de traspatio (Brown y Bevins 2017). La distribución geográfica del VEN es amplia, y no es definida, reportándose casos esporádicos regulares a lo largo de los años desde las áreas endémicas. Los reportes insuficientes de EN en países endémicos, especialmente en áreas donde el VEN virulento es endémico en aves de corral, podría significar una subestimación de la situación epidemiológica en estos países.

Las cepas del VEN que tienen diversos grados de virulencia circulan entre especies aviares domésticas y silvestres, siendo la mayor fuente del VEN las aves domésticas, de las cuales se han aislado cepas virulentas y lentogénicas (Liu *et al.*, 2013). En cambio, en las aves silvestres se han aislado sólo cepas lentogénicas (Pedersen *et al.*, 2016). De igual manera, trabajos realizados en nuestro país corroboran la presencia de cepas lentogénicas de VEN en poblaciones de aves en humedales de la costa peruana y en aves silvestres y exóticas procedentes de mercados de aves vivas (Mendoza *et al.*, 2009; Ventocilla *et al.*, 2011). Asimismo, en un estudio de la FMV-UNMSM, se ha demostrado que la tórtola (*Eupelia cruziana*) y la paloma (*Columba livia*), especies muy comunes en las cercanías de granjas avícolas del Perú, son susceptibles al VEN, manifestando signos nerviosos, mortalidad y eliminación viral en hisopados de cloaca cuando fueron inoculadas experimentalmente, indicando que estas aves pueden ser diseminadoras de la enfermedad (Caballero, 2003; Vargas *et al.*, 2004). No obstante, es necesario seguir con los monitoreos y estudios de VEN en las poblaciones de aves silvestres y exóticas para esclarecer el tipo de cepa mediante caracterización molecular, y así determinar su origen y distancia filogenética respecto a otros VEN presentes en nuestro territorio. Además de determinar su virulencia y patogenicidad, con el objetivo de comprender mejor el rol de las aves silvestres y exóticas en la

epidemiología de la enfermedad y si representan un riesgo en la diseminación de VEN hacia las granjas de aves de producción.

Con respecto al VEN prevalente en nuestro medio, el genotipo XII, éste fue caracterizado por primera vez a partir de una cepa de VEN virulento aislada en Perú de un brote en el 2008 (Diel *et al.*, 2012b). Adicionalmente, fue clasificado como perteneciente al genotipo XII (Diel *et al.*, 2012a), representando el primer aislado dentro de este grupo junto con otros aislados de VENv provenientes de gansos de mercados de aves vivas en China (Liu *et al.*, 2013). Recientemente, otros estudios de caracterización filogenética realizados en nuestro país han diferenciado este genotipo en dos subclases, siendo la subclase XIIa aislados de Sudamérica, y XIIb de origen chino (Chumbe *et al.*, 2015, 2017b). Asimismo se considera la subclase XIIa como la más prevalente en los brotes de Perú (Chumbe *et al.*, 2017b). Sin embargo no existe hasta el momento una relación entre las cepas del genotipo XII aisladas en China y las cepas aisladas en Perú, por esta razón es necesario que se realicen más estudios para determinar el origen de estas cepas.

El manejo efectivo de la EN requiere de una identificación rápida y determinación de virulencia del VEN causante del brote. Sin embargo, estos diagnósticos se ven obstaculizados por la diversidad genética y la rápida evolución de los APMV-1. Por esta razón, las investigaciones actuales están dirigidas hacia la innovación de las técnicas de diagnóstico, de las cuales destaca la secuenciación MinION AmpSeq (Nanopore technologies) (Wang *et al.*, 2015; Butt *et al.*, 2018), la cual mejora información obtenida con una longitud más amplia del producto que la de los PCR, además permite una mayor flexibilidad en el diseño de la prueba, que puede aplicarse ampliamente a la detección y caracterización de numerosos agentes infecciosos.

Por otro lado, las medidas de control usadas en países enzooticos como el uso extensivo de vacunas, bioseguridad, cuarentena estricta, combinado con diagnóstico rápido, restricción del movimiento de animales y otras medidas de contención parecen mantener a la EN bajo control. En estudios realizados en el laboratorio de Patología Aviar de la UNMSM, se han evaluado diferentes

programas vacunales utilizando vacunas vivas, vivas más inactivadas, vacunas vectorizadas, o vacunas vectorizadas más vacuna viva, con diversos resultados, en su mayoría obteniendo protección vacunal contra signos clínicos, mortalidad y secuelas nerviosas mayor a 90%. Aún así la protección con algunos programas vacunales por ejemplo de sólo cepas entéricas, o cepas entéricas más inactivadas no proporcionan suficiente protección vacunal (Chávez, 2014) para una región con virus de desafío de alta patogenicidad como el VEN genotipo XII presente en nuestro país. Asimismo, a pesar de que experimentalmente el uso de una vacuna vectorizada contra VEN obtuvo una óptima protección contra la EN, según observaciones de campo un programa vacunal de sólo vacuna vectorizada de VEN al primer día no es suficiente para proteger a las aves contra un desafío de VENv, por esta razón se recomienda el uso de una vacuna viva en conjunto con el uso de vacuna vectorizada. Estas observaciones sugieren que otros factores como estado inmune del lote, presencia de enfermedades previas o estrés por las condiciones de crianza juegan un rol importante en el desarrollo de una correcta inmunidad en crianzas intensivas de pollos.

En consecuencia, los brotes múltiples en diferentes regiones del mundo hacen notar que las estrategias de vacunación actual no son completamente eficaces bajo diferentes condiciones ambientales y el desarrollo de nuevos conceptos de generación de vacunas son necesarios (Dimitrov *et al.*, 2017). Para mejorar la eficacia de las vacunas y aumentar la respuesta inmune inducida por estas, los estudios se están enfocando en el desarrollo de nuevos tipos de vacuna y adyuvantes fuertes y seguros. Un ejemplo de esto es el sistema de genética reversa que diseña VEN quimeras como un vector de vacuna portando genes homólogos a los virus de campo circulantes o sustituyendo las secuencias de un virus virulento de campo para convertirlo en lentogénico (Hu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015; Izquierdo-Lara *et al.*, 2018). Este tipo de vacunas ha demostrado en diversos estudios que reducen la eliminación viral y tienen una mayor compatibilidad antigénica con la cepa de desafío homólogo que la cepa heteróloga de genotipo II usada en las vacunas tradicionales (Pfaller *et al.*, 2015). A pesar de décadas de investigación y desarrollo hacia la formulación de una vacuna EN óptima, todavía se necesitan mejoras.

Finalmente, el uso del VEN en la terapia contra el cáncer está produciendo mucha información sobre la interacción de los genes implicados en la adherencia, entrada a la célula y replicación. A través

de la genética reversa el virus puede modificarse para expresar un gen foráneo y al mismo tiempo conservar la capacidad de crecer a títulos altos en cultivos celulares, muy necesarios para mantener la viabilidad del virus como agente anticancerígeno (Cheng *et al.*, 2016). Por lo tanto, el VEN como agente oncolítico ha ganado una gran atención y proporcionaría una terapia alternativa para el tratamiento del cáncer en los próximos años.

#### **IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

- El reporte de brotes de la enfermedad a las autoridades es importante para implementar las medidas adecuadas para su control y erradicación en una zona determinada.
- En los países endémicos como el Perú, la vacunación obligatoria y la bioseguridad son importantes para prevenir y controlar la EN.
- El VEN está en evolución permanente, debido al surgimiento de nuevas cepas virulentas, por esta razón el monitoreo constante para la detección del VEN debe realizarse en aves domésticas de traspatio, de crianza tecnificada y aves silvestres.
- Estudios epidemiológicos moleculares del VEN son necesarios para tener información sobre las cepas de VEN circulantes en nuestra región.



## VI. LITERATURA CITADA

1. **Abenes GB, Kida H, Yanagawa R. 1986.** Biological activities of monoclonal antibodies to the hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein of Newcastle disease virus. *Nihon Juigaku Zasshi* 48: 353-362.
2. **Absalón AE, Cortés-Espinosa DV, Lucio E, Miller PJ, Afonso CL. 2019.** Epidemiology, control, and prevention of Newcastle disease in endemic regions: Latin America. *Trop Anim Health Prod* 51:1033–1048.
3. **Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ, Kropinski AM, Krupovic M, Kuhn JH, Mushegian AR, Nibert M, Sabanadzovic S, Sanfacon H, Siddell SG, Simmonds P, Varsani A, Zerbini FM, Gorbalenya AE, Davison AJ. 2017.** Changes to taxonomy and the international code of virus classification and nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Arch Virol* 162: 2505-2538.
4. **Afonso CL y Miller PJ. 2013.** Newcastle disease: progress and gaps in the development of vaccines and diagnostic tools. *Dev Biol (Basel)* 135: 95-106.
5. **Alders RG. 2014.** Making Newcastle disease vaccines available at village level. *Vet Rec* 174: 502-503.
6. **Aldous EW y Alexander DJ. 2001.** Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathol* 30: 117-128.
7. **Aldous EW, Collins MS, McGoldrick A, Alexander DJ. 2001.** Rapid pathotyping of Newcastle disease virus (NDV) using fluorogenic probes in a PCR assay. *Vet Microbiol* 80: 201-212.
8. **Aldous EW, Mynn JK, Banks J, Alexander DJ. 2003.** A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathol* 32: 239-256.
9. **Aldous EW, Seekings JM, McNally A, Nili H, Fuller CM, Irvine RM, Alexander DJ, Brown IH. 2010.** Infection dynamics of highly pathogenic avian influenza and virulent avian paramyxovirus type 1 viruses in chickens, turkeys and ducks. *Avian Pathol* 39: 265-273.

10. **Alexander DJ. 2000a.** Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev Sci Tech* 19: 443-462.
11. **Alexander DJ. 2000b.** Newcastle disease in ostriches (*Struthio camelus*) a review. *Avian Pathol* 29: 95-100.
12. **Alexander DJ. 2001.** Gordon memorial lecture. Newcastle disease. *Br Poult Sci* 42: 5-22.
13. **Alexander DJ. 2009.** Ecology and epidemiology of Newcastle disease. En: Capua I, Alexander DJ, eds. *Avian Influenza and Newcastle disease: a field and laboratory manual*. USA: Springer. p 19–26.
14. **Alexander DJ, Morris HT, Pollitt WJ, Sharpe CE, Eckford RL, Sainsbury RM, Mansley LM, Gough RE, Parsons G. 1998.** Newcastle disease outbreaks in domestic fowl and turkeys in Great Britain during 1997. *Vet Rec* 143: 209-212.
15. **Alexander DJ, Parsons G. 1984.** Avian paramyxovirus type 1 infections of racing pigeons: 2 pathogenicity experiments in pigeons and chickens. *Vet Rec* 114: 466-469.
16. **Alexander DJ, Russell PH, Parsons G, Elzein EM, Ballouh A, Cernik K, Engstrom B, Fevereiro M, Fleury HJ, Guittet M, Kaleta EF, Kihm U, Kusters J, Lomniczi B, Meister J, Meulemans G, Nerome K, Petek M, Pokomunski S, Polten B, Prip M, Richter R, Saghy E, Samberg Y, Spanoghe L, Tumova B. 1985.** Antigenic and biological characterisation of avian paramyxovirus type I isolates from pigeons: an international collaborative study. *Avian Pathol* 14: 365-376.
17. **Alexander DJ y Senne DA. 2008.** Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. En: Dufour-Zavala L, Senne DA, Glisson JR, eds. *A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens*. 5<sup>ta</sup> ed. Athens, USA: American Association of Avian Pathologists p 135–141.
18. **Alexander DJ y Senne DA. 2008.** Newcastle Disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. En: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE, eds. *Diseases of poultry*. 12<sup>va</sup> ed. USA: Iowa State University Press. p 75–116.
19. **Amarasinghe GK, Arechiga Ceballos NG, Banyard AC, Basler CF, Bavari S, Bennett AJ, Blasdell KR, Briese T, Bukreyev A, Cai Y, Calisher CH, Campos Lawson C, Chandran K, Chapman CA, Chiu CY, Choi KS, Collins PL, Dietzgen RG, Dolja VV, Dolnik O, Domier LL,**

- Durrwald R, Dye JM, Easton AJ, Ebihara H, Echevarria JE, Fooks AR, Formenty PB, Fouchier RA, Freuling CM, Ghedin E, Goldberg TL, Hewson R, Horie M, Hyndman TH, Jiang D, Kityo R, Kobinger GP, Kondo H, Koonin EV, Krupovic M, Kurath G, Lamb RA, Lee B, Leroy EM, Maes P, Maisner A, Marston DA, Mor SK, Muller T, Muhlberger E, Ramirez VM, Netesov SV, Ng TF, Nowotny N, Palacios G, Patterson JL, Paweska JT, Payne SL, Prieto K, Rima BK, Rota P, Rubbenstroth D, Schwemmle M, Siddell S, Smither SJ, Song Q, Song T, Stenglein MD, Stone DM, Takada A, Tesh RB, Thomazelli LM, Tomonaga K, Tordo N, Towner JS, Vasilakis N, Vazquez-Moron S, Verdugo C, Volchkov VE, Wahl V, Walker PJ, Wang D, Wang LF, Wellehan JF, Wiley MR, Whitfield AE, Wolf YI, Ye G, Zhang YZ, Kuhn JH. 2018. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2018. Arch Virol 163: 2283-2294.*
20. *Wakenell PS, Thayer SG, Beard CW. 2016. Serologic procedures. En: Williams SM, Dufour-Zavala L, Jackwood MW, Lee MD, Lupiani B, Reed WM, Spackman E, eds. A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens. 6<sup>ta</sup> ed. Athens, USA: American Association of Avian Pathologists. p 343-347.*
  21. *Anis Z, Morita T, Azuma K, Ito H, Ito T, Shimada A. 2013. Histopathological alterations in immune organs of chickens and ducks after experimental infection with virulent 9a5b Newcastle disease virus. J Comp Pathol 149: 82-93.*
  22. *Anónimo. 2011. World livestock disease atlas. A quantitative analysis of global animal health data (2006–2009). En: forum T.I.B.f.R.a.D.T.W.B.a.T.T. Washington, DC.*
  23. *Ashton PM, Nair S, Dallman T, Rubino S, Rabsch W, Mwaigwisya S, Wain J, O'Grady J. 2015. MinION nanopore sequencing identifies the position and structure of a bacterial antibiotic resistance island. Nat Biotechnol 33: 296-300.*
  24. *Awad F, Forrester A, Baylis M, Lemiere S, Jones R, Ganapathy K. 2015. Immune responses and interactions following simultaneous application of live Newcastle disease, infectious bronchitis and avian metapneumovirus vaccines in specific-pathogen-free chicks. Res Vet Sci 98: 127-133.*
  25. *Ayala AJ, Dimitrov KM, Becker CR, Goraichuk IV, Arns CW, Bolotin VI, Ferreira HL, Gerilovych AP, Goujgoulouva GV, Martini MC, Muzyka DV, Orsi MA, Scagion GP, Silva RK,*

- Solodiankin OS, Stegny BT, Miller PJ, Afonso CL. 2016.** Presence of vaccine-derived Newcastle disease viruses in wild birds. *PLoS One* 11: e0162484.
26. **Aziz UR, Munir M, Shabbir MZ. 2018.** Comparative evolutionary and phylogenomic analysis of Avian Avulaviruses 1-20. *Mol Phylogenet Evol* 127: 931-951.
  27. **Banerjee M, Reed WM, Fitzgerald SD, Panigraphy B. 1994.** Neurotropic velogenic Newcastle disease in cormorants in Michigan: pathology and virus characterization. *Avian Dis* 38: 873-878.
  28. **Bang FB, Libert R. 1952.** The effect of Newcastle disease virus on chicken red blood cells. II. A study of the adsorption, sensitization and elution processes. *Am J Hyg* 55: 373-385.
  29. **Barber MR, Aldridge JR Jr, Webster RG, Magor KE. 2010.** Association of RIG-I with innate immunity of ducks to influenza. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 5913-5918.
  30. **Beach JR. 1944.** The neutralization in vitro of avian pneumoencephalitis virus by Newcastle disease immune serum. *Science* 100: 361-362.
  31. **Beard CW y Hanson RP. 1984.** Newcastle disease. En: Hofstad MS, Barnes HJ, Calnek BW, Reid WM y Yoder HW, eds. *Diseases of Poultry*. 8<sup>va</sup> ed. USA: Iowa State University Press. p 452–470.
  32. **Bello MB, Yusoff K, Ideris A, Hair-Bejo M, Peeters BP, Omar AR. 2018.** Diagnostic and vaccination approaches for Newcastle Disease Virus in poultry: the current and emerging perspectives. *Biomed Res Int* 2018: 7278459.
  33. **Berhane Y, Hisanaga T, Xu W, Mosos Campos NA, Kehler H, Calderon Parra CP, Pasick J. 2017.** Characterization of Colombian serotype 1 avian paramyxoviruses, 2008-2010. *Virus Genes* 53: 584-592.
  34. **Biswas M, Johnson JB, Kumar SR, Parks GD, Elankumarana S. 2012.** Incorporation of host complement regulatory proteins into Newcastle disease virus enhances complement evasion. *J Virol* 86: 12708-12716.
  35. **Blaxland JD. 1951.** Newcastle disease in shags and cormorants and its significance as a factor in the spread f this disease among domestic poultry. *Vet Rec* 63: 731-733.
  36. **Bournsnel ME, Green PF, Campbell JI, Deuter A, Peters RW, Tomley FM, Samson AC, Chambers P, Emmerson PT, Binns MM. 1990.** Insertion of the fusion gene from Newcastle disease

- virus into a non-essential region in the terminal repeats of fowlpox virus and demonstration of protective immunity induced by the recombinant. *J Gen Virol* 71: 621-628.
37. **Bowie AG, Unterholzner L. 2008.** Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 8: 911-922.
  38. **Brandly CA. 1964.** Recognition of Newcastle disease as a new disease. En: Hanson RP, ed. *Newcastle Disease an Evolving Pathogen*. 1<sup>er</sup> ed. Madison: University of Wisconsin Press. p. 53-69.
  39. **Brown VR, Bevins SN. 2017.** A review of virulent Newcastle disease viruses in the United States and the role of wild birds in viral persistence and spread. *Vet Res* 48: 68.
  40. **Buendia R. 2014.** Detección del virus de la enfermedad de Newcastle en patos criollos (*Cairina moschata*) de traspatio. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 65 p.
  41. **Burnet FM. 1949.** Haemolysis by Newcastle disease virus. *Nature* 164: 1008.
  42. **Burridge MJ, Riemann HP, Utterback WW. 1975.** Methods of spread of velogenic viscerotropic Newcastle disease virus in the southern Californian epidemic of 1971-1973. *Avian Dis* 19: 666-678.
  43. **Butt SL, Taylor TL, Volkening JD, Dimitrov KM, Williams-Coplin D, Lahmers KK, Miller PJ, Rana AM, Suarez DL, Afonso CL, Stanton JB. 2018.** Rapid virulence prediction and identification of Newcastle disease virus genotypes using third-generation sequencing. *Virol J* 15: 179.
  44. **Bwala DG, Clift S, Duncan NM, Bisschop SP, Oludayo FF. 2012.** Determination of the distribution of lentogenic vaccine and virulent Newcastle disease virus antigen in the oviduct of SPF and commercial hen using immunohistochemistry. *Res Vet Sci* 93: 520-528.
  45. **Caballero F. 2003.** Evaluación experimental de la patogenicidad de un virus velogénico viscerotrópico de la enfermedad de Newcastle y su respuesta inmune humoral en aves columbiforme. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 44 p.
  46. **Capua I, Scacchia M, Toscani T, Caporale V. 1993.** Unexpected isolation of virulent Newcastle disease virus from commercial embryonated fowls' eggs. *Zentralbl Veterinarmed B* 40: 609-612.

47. **Cardenas-Garcia S, Diel DG, Susta L, Lucio-Decanini E, Yu Q, Brown CC, Miller PJ, Afonso CL. 2015.** Development of an improved vaccine evaluation protocol to compare the efficacy of Newcastle disease vaccines. *Biologicals* 43: 136-145.
48. **Cassel WA, Garrett RE. 1965.** Newcastle disease virus as an antineoplastic agent. *Cancer* 18: 863-868.
49. **Cattoli G, Susta L, Terregino C, Brown C. 2011.** Newcastle disease: a review of field recognition and current methods of laboratory detection. *J Vet Diagn Invest* 23: 637-656.
50. **Pagina we. [CDFA].** California Department of Food and Agriculture. 2016. Poultry facilities biosecurity risk assessment guide. Version 2. [Internet], [22 julio 2019]. Disponible en: [https://www.cdfa.ca.gov/ahfss/animal\\_health/biospecies/pdfs/CDFAPoultryFacilitybiosecurityRiskAssessmentGuide.pdf](https://www.cdfa.ca.gov/ahfss/animal_health/biospecies/pdfs/CDFAPoultryFacilitybiosecurityRiskAssessmentGuide.pdf).
51. **Cleary L. 1977.** Succes de reproduction du cormoran i aigrettes, *Phalacrocorax auritus auritus*, sur trois Iles du St.-Laurent, en 1975 et 1976. Tesis de Magíster. Quebec: Universidad Laval. 42 p.
52. **Collett SR. 2013.** Capítulo: Principles of disease prevention, diagnosis, and control introduction. En: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair VL, eds. *Diseases of Poultry*. 13<sup>va</sup> ed. USA: American Association Avian Pathologists. p 35-37.
53. **Conza, L. 2012.** Caracterización molecular del virus de la enfermedad de Newcastle aislado de aves de diferentes regiones del Perú. Tesis de Magíster. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 51 p.
54. **Cornax I, Diel DG, Rue CA, Estevez C, Yu Q, Miller PJ, Afonso CL. 2013.** Newcastle disease virus fusion and haemagglutinin-neuraminidase proteins contribute to its macrophage host range. *J Gen Virol* 94: 1189-1194.
55. **Cornax I, Miller PJ, Afonso CL. 2012.** Characterization of live LaSota vaccine strain-induced protection in chickens upon early challenge with a virulent Newcastle disease virus of heterologous genotype. *Avian Dis* 56: 464-470.
56. **Cortez S. 1970.** Estudio retrospectivo de las principales enfermedades diagnosticadas en el Laboratorio de Patología Aviar durante 1956-1969. Tesis. Lima: Univ. Nac. Mayor San Marcos. 15 p.

57. **Courtney SC, Susta L, Gomez D, Hines NL, Pedersen JC, Brown CC, Miller PJ, Afonso CL. 2013.** Highly divergent virulent isolates of Newcastle disease virus from the Dominican Republic are members of a new genotype that may have evolved unnoticed for over 2 decades. *J Clin Microbiol* 51: 508-517.
58. **Cox RM, Plemper RK. 2017.** Structure and organization of paramyxovirus particles. *Curr Opin Virol* 24: 105-114.
59. **Czegledi A, Ujvari D, Somogyi E, Wehmann E, Werner O, Lomniczi B. 2006.** Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Res* 120: 36-48.
60. **Czegledi A, Wehmann E, Lomniczi B. 2003.** On the origins and relationships of Newcastle disease virus vaccine strains Hertfordshire and Mukteswar, and virulent strain Herts'33. *Avian Pathol* 32: 271-276.
61. **Chakrabarti S, King DJ, Afonso C, Swayne D, Cardona CJ, Kuney DR, Gerry AC. 2007.** Detection and isolation of exotic Newcastle disease virus from field-collected flies. *J Med Entomol* 44: 840-844.
62. **Chambers JP, Arulanandam BP, Matta LL, Weis A, Valdes JJ. 2008.** Biosensor recognition elements. *Curr Issues Mol Biol* 10: 1-12.
63. **Chambers P, Samson AC. 1982.** Non-structural proteins in Newcastle disease virus-infected cells. *J Gen Virol* 58 Pt 1: 1-12.
64. **Chávez L. 2014.** Efectividad de tres programas vacunales contra la enfermedad de Newcastle usando vacunas entéricas. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 22 p.
65. **Chen JP, Wang CH. 2002.** Clinical epidemiologic and experimental evidence for the transmission of Newcastle disease virus through eggs. *Avian Dis* 46: 461-465.
66. **Cheng X, Wang W, Xu Q, Harper J, Carroll D, Galinski MS, Suzich J, Jin H. 2016.** Genetic modification of oncolytic Newcastle disease virus for cancer therapy. *J Virol* 90: 5343-5352.
67. **Childs K, Randall R, Goodbourn S. 2012.** Paramyxovirus V proteins interact with the RNA helicase LGP2 to inhibit RIG-I-dependent interferon induction. *J Virol* 86: 3411-3421.

68. **Cho SH, Kwon HJ, Kim TE, Kim JH, Yoo HS, Park MH, Park YH, Kim SJ. 2008.** Characterization of a recombinant Newcastle disease virus vaccine strain. *Clin Vaccine Immunol* 15: 1572-1579.
69. **Chumbe A, Izquierdo-Lara R, Calderon K, Fernandez-Diaz M, Vakharia VN. 2017a.** Development of a novel Newcastle disease virus (NDV) neutralization test based on recombinant NDV expressing enhanced green fluorescent protein. *Virol J* 14: 232.
70. **Chumbe A, Izquierdo-Lara R, Tataje-Lavanda L, Figueroa A, Segovia K, Gonzalez R, Cribillero G, Montalvan A, Fernandez-Diaz M, Icochea E. 2015.** Characterization and sequencing of a genotype XII Newcastle disease virus isolated from a peacock (*Pavo cristatus*) in Peru. *Genome Announc* 3.
71. **Chumbe A, Izquierdo-Lara R, Tataje L, Gonzalez R, Cribillero G, Gonzalez AE, Fernandez-Diaz M, Icochea E. 2017b.** Pathotyping and phylogenetic characterization of Newcastle disease viruses isolated in Peru: defining two novel subgenotypes within genotype XII. *Avian Dis* 61: 16-24.
72. **Dai Y, Cheng X, Liu M, Shen X, Li J, Yu S, Zou J, Ding C. 2014.** Experimental infection of duck origin virulent Newcastle disease virus strain in ducks. *BMC Vet Res* 10: 164.
73. **Daut EF, Lahodny GJr, Peterson MJ, Ivanek R. 2016.** Interacting effects of Newcastle disease transmission and illegal trade on a wild population of white-winged parakeets in Peru: a modeling approach. *PLoS One* 11: e0147517.
74. **De Battisti C, Salomoni A, Ormelli S, Monne I, Capua I, Cattoli G. 2013.** Rapid pathotyping of Newcastle disease virus by pyrosequencing. *J Virol Methods* 188: 13-20.
75. **De Bruyn J, Thomson PC, Bagnol B, Maulaga W, Rukambile E, Alders RG. 2017.** The chicken or the egg? exploring bi-directional associations between Newcastle disease vaccination and village chicken flock size in rural Tanzania. *PLoS One* 12: e0188230.
76. **De Geus ED, Rebel JM, Vervelde L. 2012.** Induction of respiratory immune responses in the chicken; implications for development of mucosal avian influenza virus vaccines. *Vet Q* 32: 75-86.
77. **De Leeuw OS, Koch G, Hartog L, Ravenshorst N, Peeters BP. 2005.** Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin-neuraminidase protein. *J Gen Virol* 86: 1759-1769.



78. **Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, Couto N, Ferdous M, Garcia-Cobos S, Kooistra-Smid AM, Raangs EC, Rosema S, Veloo AC, Zhou K, Friedrich AW, Rossen JW. 2017.** Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J Biotechnol* 243: 16-24.
79. **Diel DG, Da Silva LH, Liu H, Wang Z, Miller PJ, Afonso CL. 2012a.** Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infect Genet Evol* 12: 1770-1779.
80. **Diel DG, Susta L, Cardenas Garcia S, Killian ML, Brown CC, Miller PJ, Afonso CL. 2012b.** Complete genome and clinicopathological characterization of a virulent Newcastle disease virus isolate from South America. *J Clin Microbiol* 50: 378-387.
81. **Dimitrov KM, Abolnik C, Afonso CL, Albina E, Bahl J, Berg M, Briand FX, Brown IH, Choi KS, Chvala I, Diel DG, Durr PA, Ferreira HL, Fusaro A, Gil P, Goujgoulova GV, Grund C, Hicks JT, Joannis TM, Torchetti MK, Kolosov S, Lambrecht B, Lewis NS, Liu H, Liu H, McCullough S, Miller PJ, Monne I, Muller CP, Munir M, Reischak D, Sabra M, Samal SK, Servan de Almeida R, Shittu I, Snoeck CJ, Suarez DL, Van Borm S, Wang Z, Wong FYK. 2019.** Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus. *Infection, Genetics and Evolution* 74:103917.
82. **Dimitrov KM, Afonso CL, Yu Q, Miller PJ. 2017a.** Newcastle disease vaccines-a solved problem or a continuous challenge? *Vet Microbiol* 206: 126-136.
83. **Dimitrov KM, Ramey AM, Qiu X, Bahl J, Afonso CL. 2016.** Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus). *Infect Genet Evol* 39: 22-34.
84. **Dimitrov KM, Sharma P, Volkening JD, Goraichuk IV, Wajid A, Rehmani SF, Basharat A, Shittu I, Joannis TM, Miller PJ, Afonso CL. 2017b.** A robust and cost-effective approach to sequence and analyze complete genomes of small RNA viruses. *Virol J* 14: 72.
85. **Doria-Rose NA, Haigwood NL. 2003.** DNA vaccine strategies: candidates for immune modulation and immunization regimens. *Methods* 31: 207-216.
86. **Dortmans JC, Koch G, Rottier PJ, Peeters BP. 2011a.** Virulence of Newcastle disease virus: what is known so far? *Vet Res* 42: 122.

87. **Dortmans JC, Peeters BP, Koch G. 2012.** Newcastle disease virus outbreaks: vaccine mismatch or inadequate application? *Vet Microbiol* 160: 17-22.
88. **Dortmans JC, Rottier PJ, Koch G, Peeters BP. 2010.** The viral replication complex is associated with the virulence of Newcastle disease virus. *J Virol* 84: 10113-10120.
89. **Dortmans JC, Rottier PJ, Koch G, Peeters BP. 2011b.** Passaging of a Newcastle disease virus pigeon variant in chickens results in selection of viruses with mutations in the polymerase complex enhancing virus replication and virulence. *J Gen Virol* 92: 336-345.
90. **Doyle TM. 1935.** Newcastle disease of fowls. *The journal of comparative pathology and therapeutics* 48: 1-20.
91. **Ecco R, Susta L, Afonso CL, Miller PJ, Brown C. 2011.** Neurological lesions in chickens experimentally infected with virulent Newcastle disease virus isolates. *Avian Pathol* 40: 145-152.
92. **Elankumaran S. 2013.** Genetically engineered Newcastle disease virus for prostate cancer: a magic bullet or a misfit. *Expert Rev Anticancer Ther* 13: 769-772.
93. **Elankumaran S, Rockemann D, Samal, SK. 2006.** Newcastle disease virus exerts oncolysis by both intrinsic and extrinsic caspase-dependent pathways of cell death. *J Virol* 80: 7522-7534.
94. **Erickson GA, Mare CJ, Gustafson GA, Miller LD, Proctor SJ, Carlbrey EA. 1977.** Interactions between viscerotropic velogenic Newcastle diseases virus and pet birds of six species. I clinical and serologic responses, and viral excretion. *Avian Dis* 21: 642-654.
95. **Esaki M, Godoy A, Rosenberger JK, Rosenberger SC, Gardin Y, Yasuda A, Dorsey KM. 2013.** Protection and antibody response caused by turkey herpesvirus vector Newcastle disease vaccine. *Avian Dis* 57: 750-755.
96. **Farkas T, Szekely E, Belak S, Kiss I. 2009.** Real-time PCR-based pathotyping of Newcastle disease virus by use of TaqMan minor groove binder probes. *J Clin Microbiol* 47: 2114-2123.
97. **Ferrer R, Icochea E, Salas A y Alba M. 2008.** Prevalencia de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle en gallus gallus de Lima. Estudio de caso-control. *Rev Inv Vet Perú*, 19 (1): 67-74.
98. **Firouzamandi M, Moeini H, Hosseini D, Bejo MH, Omar AR, Mehrbod P, Ideris A. 2016a.** Improved immunogenicity of Newcastle disease virus inactivated vaccine following DNA

vaccination using Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase and fusion protein genes. J Vet Sci 17: 21-26.

99. **Firouzamandi M, Moeini H, Hosseini SD, Bejo MH, Omar AR, Mehrbod P, El Zowalaty ME, Webster TJ, Ideris A. 2016b.** Preparation, characterization, and in ovo vaccination of dextran-spermine nanoparticle DNA vaccine coexpressing the fusion and hemagglutinin genes against Newcastle disease. Int J Nanomedicine 11: 259-267.
100. **Fukanoki S, Iwakura T, Iwaki S, Matsumoto K, Takeda R, Ikeda K, Shi Z, Mori H. 2001.** Safety and efficacy of water-in-oil-in-water emulsion vaccines containing Newcastle disease virus haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein. Avian Pathol 30: 509-516.
101. **Ganapathy K, Cargill P, Montiel E, Jones RC. 2005.** Interaction between live avian pneumovirus and Newcastle disease virus vaccines in specific pathogen free chickens. Avian Pathol 34: 297-302.
102. **Ganar K, Das M, Sinha S, Kumar S. 2014.** Newcastle disease virus: current status and our understanding. Virus Res 184: 71-81.
103. **Gelb J Jr, Ladman BS, Licata MJ, Shapiro MH, Campion LR. 2007.** Evaluating viral interference between infectious bronchitis virus and Newcastle disease virus vaccine strains using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. Avian Dis 51: 924-934.
104. **Ghildyal R, Mills J, Murray M, Vardaxis N, Meanger J. 2002.** Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. J Gen Virol 83: 753-757.
105. **Giambrone JJ, Closser J. 1990.** Effect of breeder vaccination on immunization of progeny against Newcastle disease. Avian Dis 34: 114-119.
106. **Goff PH, Krammer F, Hai R, Seibert CW, Margine I, Garcia-Sastre A, Palese P. 2013.** Induction of cross-reactive antibodies to novel H7N9 influenza virus by recombinant Newcastle disease virus expressing a North American lineage H7 subtype hemagglutinin. J Virol 87: 8235-8240.
107. **Gogoi P, Ganar K, Kumar S. 2017.** Avian paramyxovirus: a brief review. Transbound Emerg Dis 64: 53-67.

108. **Goldhaft TM. 1980.** Historical note on the origin of the LaSota strain of Newcastle disease virus. *Avian Dis* 24: 297-301.
109. **Gould AR, Kattenbelt JA, Selleck P, Hansson E, Della-Porta A, Westbury HA. 2001.** Virulent Newcastle disease in Australia: molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998-2000. *Virus Res* 77: 51-60.
110. **Greninger AL, Naccache SN, Federman S, Yu G, Mbala P, Bres V, Stryke D, Bouquet J, Somasekar S, Linnen JM, Dodd R, Mulembakani P, Schneider BS, Muyembe-Tamfum JJ, Stramer SL, Chiu CY. 2015.** Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis. *Genome Medicine* 7: 99.
111. **Grund C, Steglich C, Huthmann E, Beer M, Mettenleiter TC, Romer-Oberdorfer A. 2014.** Avian paramyxovirus-8 immunization reduces viral shedding after homologous APMV-8 challenge but fails to protect against Newcastle disease. *Virol J* 11: 179.
112. **Haddas R, Meir R, Perk S, Horowitz I, Lapin E, Rosenbluth E, Lublin A. 2014.** Newcastle disease virus in little owls (*Athene noctua*) and African penguins (*Spheniscus demersus*) in an Israeli zoo. *Transbound Emerg Dis* 61: e79-82.
113. **Hamal KR, Burgess SC, Pevzner IY, Erf GF. 2006.** Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. *Poult Sci* 85: 1364-1372.
114. **Han X, Lin X, Liu B, Hou Y, Huang J, Wu S, Liu J, Mei L, Jia G, Zhu Q. 2008.** Simultaneously subtyping of all influenza A viruses using DNA microarrays. *J Virol Methods* 152: 117-121.
115. **Hanson RP. 1980.** Newcastle disease. En: Hitchner SB, Domermuth CH, Purchase HG, Williams JE, eds. *Isolation and Identification of Avian Pathogens*. 2<sup>da</sup> ed. TX: American Association Avian Pathologists. p 63–66.
116. **Hauck R, Crossley B, Rejmanek D, Zhou H y Gallardo RA. 2016.** Persistence of highly pathogenic and low pathogenic avian influenza viruses in footbaths and poultry manure. *Avian Dis*. 61:64–69.
117. **He Y, Taylor TL, Dimitrov KM, Butt SL, Stanton JB, Goraichuk IV, Fenton H, Poulson R, Zhang J, Brown CC, Isidoro-Ayza M, Afonso CL. 2018.** Whole-genome sequencing of genotype

- VI Newcastle disease viruses from formalin-fixed paraffin-embedded tissues from wild pigeons reveals continuous evolution and previously unrecognized genetic diversity in the U.S. *Viol J* 15: 9.
118. **Heckert RA. 1993.** Ontario: Newcastle disease in cormorants. *Can Vet J* 34: 184.
  119. **Heller MJ. 2002.** DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annu Rev Biomed Eng* 4: 129-153.
  120. **Hines NL, Killian ML, Pedersen JC, Reising MM, Mosos NA, Mathieu-Benson C, Miller CL. 2012.** An rRT-PCR assay to detect the matrix gene of a broad range of avian paramyxovirus serotype-1 strains. *Avian Dis* 56: 387-395.
  121. **Hitchner SB. 1975.** Serendipity in science-discovery of the B-1 strain of Newcastle disease virus. *Avian Dis* 19: 215-223.
  122. **Hoerr FJ. 2010.** Clinical aspects of immunosuppression in poultry. *Avian Dis* 54: 2-15.
  123. **Hoffmann B, Beer M, Reid SM, Mertens P, Oura CA, Van Rijn PA, Slomka MJ, Banks J, Brown IH, Alexander DJ, King DP. 2009.** A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Vet Microbiol* 139: 1-23.
  124. **Homma M, Ouchi M. 1973.** Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. 3. Structural difference of Sendai viruses grown in eggs and tissue culture cells. *J Virol* 12: 1457-1465.
  125. **Hu Z, Hu S, Meng C, Wang X, Zhu J, Liu X. 2011.** Generation of a genotype VII Newcastle disease virus vaccine candidate with high yield in embryonated chicken eggs. *Avian Dis* 55: 391-397.
  126. **Hu S, Ma H, Wu Y, Liu W, Wang X, Liu Y, Liu X. 2009.** A vaccine candidate of attenuated genotype VII Newcastle disease virus generated by reverse genetics. *Vaccine* 27: 904-910.
  127. **Huang Z, Krishnamurthy S, Panda A, Samal SK. 2003.** Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonist. *J Virol* 77: 8676-8685.

128. **ICTV. 2019.** Washington. International Committee on taxonomy of viruses. [Internet], [15 de noviembre de 2019]. Disponible en [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/negative-sense-rna-viruses/mononegavirales/w/paramyxoviridae/1193/genus-orthoavulavirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/mononegavirales/w/paramyxoviridae/1193/genus-orthoavulavirus)
129. **Ishihara Y, Esaki M, Saitoh S, Yasuda A. 2016.** Combination of two Marek's disease virus vectors shows effective vaccination against Marek's disease, infectious bursal disease, and Newcastle disease. *Avian Dis* 60: 473-479.
130. **Ito T, Kawaoka Y, Kameda C, Yasuda J, Kida H, Otsuki K. 1999.** Differences in receptor specificity between Newcastle disease viruses originating from chickens and waterfowl. *J Vet Med Sci* 61: 951-953.
131. **Iwasaki M, Takeda M, Shirogane Y, Nakatsu Y, Nakamura T, Yanagi Y. 2009.** The matrix protein of measles virus regulates viral RNA synthesis and assembly by interacting with the nucleocapsid protein. *J Virol* 83: 10374-10383.
132. **Izquierdo-Lara R, Chumbe A, Calderón K, Fernández-Díaz M, Vakharia VN. 2018.** Genotype-matched Newcastle disease virus vaccine confers improved protection against genotype XII challenge: the importance of cytoplasmic tails in viral replication and vaccine design. *BioRxiv* 492421.
133. **Jang J, Hong SH, Choi D, Choi KS, Kang S, Kim IH. 2010.** Overexpression of Newcastle disease virus (NDV) V protein enhances NDV production kinetics in chicken embryo fibroblasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 1509-1520.
134. **Jeong J, Kim Y, An I, Wang SJ, Kim Y, Lee HJ, Choi KS, Im SP, Min W, Oem JK, Jheong W. 2018.** Complete genome sequence of a novel avian paramyxovirus isolated from wild birds in South Korea. *Arch Virol* 163: 223-227.
135. **Jestin V, Jestin A. 1991.** Detection of Newcastle disease virus RNA in infected allantoic fluids by in vitro enzymatic amplification (PCR). *Arch Virol* 118: 151-161.
136. **Jin J, Zhao J, Ren Y, Zhong Q, Zhang G. 2016.** Contribution of HN protein length diversity to Newcastle disease virus virulence, replication and biological activities. *Sci Rep* 6: 36890.

137. **Jin JH, Cheng JL, He ZR, Ren YC, Yu XH, Song Y, Yang HM, Yang YL, Liu T, Zhang GZ. 2017.** Different origins of Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein modulate the replication efficiency and pathogenicity of the virus. *Front Microbiol* 8: 1607.
138. **Jindal N, Chander Y, Primus A, Redig PT, Goyal SM. 2010.** Isolation and molecular characterization of Newcastle disease viruses from raptors. *Avian Pathol* 39: 441-445.
139. **Jorgensen PH, Handberg KJ, Ahrens P, Manvell RJ, Frost KM, Alexander DJ. 2000.** Similarity of avian paramyxovirus serotype 1 isolates of low virulence for chickens obtained from contaminated poultry vaccines and from poultry flocks. *Vet Rec* 146: 665-668.
140. **Kaleta EF y Baldauf C. 1988.** Newcastle disease in freeliving and pet birds. En: Alexander DJ, ed. *Newcastle disease*. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers. p 197–246.
141. **Kapczynski DR, Afonso CL, Miller PJ. 2013.** Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Dev Comp Immunol* 41: 447-453.
142. **Kapczynski DR, King DJ. 2005.** Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. *Vaccine* 23: 3424-3433.
143. **Karamendin K, Kydyrmanov A, Kasymbekov Y, Asanova S, Daulbayeva K, Seidalina A, Khan E, Harrison SM, Carr IM, Goodman SJ, Moldakozhayev A, Sayatov M. 2017.** Novel avian paramyxovirus isolated from gulls in Caspian seashore in Kazakhstan. *PLoS One* 12: e0190339.
144. **Khorajiya JH, Pandey S, Ghodasara PD, Joshi BP, Prajapati KS, Ghodasara DJ, Mathakiya RA. 2015.** Patho-epidemiological study on genotype-XIII Newcastle disease virus infection in commercial vaccinated layer farms. *Vet World* 8: 372-381.
145. **Kilianski A, Haas JL, Corriveau EJ, Liem AT, Willis KL, Kadavy DR, Rosenzweig CN, Minot SS. 2015.** Bacterial and viral identification and differentiation by amplicon sequencing on the MinION nanopore sequencer. *GigaScience* 4.
146. **Kim LM, King DJ, Curry PE, Suarez DL, Swayne DE, Stallknecht DE, Slemons RD, Pedersen JC, Senne DA, Winker K, Afonso CL. 2007.** Phylogenetic diversity among low-virulence

- Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates. *J Virol* 81: 12641-12653.
147. **Kim LM, King DJ, Guzman H, Tesh RB, Travassos Da Rosa AP, Bueno R Jr, Dennett JA, Afonso CL. 2008a.** Biological and phylogenetic characterization of pigeon paramyxovirus serotype 1 circulating in wild North American pigeons and doves. *J Clin Microbiol* 46: 3303-3310.
  148. **Kim LM, Suarez DL, Afonso CL. 2008b.** Detection of a broad range of class I and II Newcastle disease viruses using a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20: 414-425.
  149. **Kim SH, Chen Z, Yoshida A, Paldurai A, Xiao S, Samal SK. 2017.** Evaluation of fusion protein cleavage site sequences of Newcastle disease virus in genotype matched vaccines. *PLoS One* 12: e0173965.
  150. **Kim SH, Xiao S, Shive H, Collins PL, Samal SK. 2012.** Replication, neurotropism, and pathogenicity of avian paramyxovirus serotypes 1-9 in chickens and ducks. *PLoS One* 7: e34927.
  151. **Kinde H, Hullinger PJ, Charlton B, McFarland M, Hietala SK, Velez V, Case JT, Garber L, Wainwright SH, Mikolon AB, Breitmeyer RE, Ardans AA. 2005.** The isolation of exotic Newcastle disease (END) virus from nonpoultry avian species associated with the epidemic of END in chickens in southern California: 2002-2003. *Avian Dis* 49: 195-198.
  152. **Kinde H, Utterback W, Takeshita K, McFarland M. 2004.** Survival of exotic Newcastle disease virus in commercial poultry environment following removal of infected chickens. *Avian Dis* 48: 669-674.
  153. **Koch G, Czifra G, Engstrom BE. 1998.** Detection of Newcastle disease virus-specific antibodies in ostrich sera by three serological methods. *Vet Rec* 143: 10-12.
  154. **Kommers GD, King DJ, Seal BS, Brown CC. 2001.** Virulence of pigeon-origin Newcastle disease virus isolates for domestic chickens. *Avian Dis* 45: 906-921.
  155. **Kouwenhoven. 1993.** Newcastle disease. En: McFerran JB, McNulty MS, eds. *Virus infection of birds*. The Netherlands: Elsevier Science. p 341–361.



156. **Kuiken T, Wobeser G, Leighton FA, Haines DM, Chelack B, Bogdan J, Hassard L, Heckert RA, Riva J. 1999.** Pathology of Newcastle disease in double-crested cormorants from Saskatchewan, with comparison of diagnostic methods. *J Wildl Dis* 35: 8-23.
157. **Kumar H, Kawai T, Kato H, Sato S, Takahashi K, Coban C, Yamamoto M, Uematsu S, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S. 2006.** Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *J Exp Med* 203: 1795-1803.
158. **Kumar S, Nayak B, Collins PL, Samal SK. 2011.** Evaluation of the Newcastle disease virus F and HN proteins in protective immunity by using a recombinant avian paramyxovirus type 3 vector in chickens. *J Virol* 85: 6521-6534.
159. **Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V. 2012.** Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine* 31: 58-83.
160. **Laamiri N, Fallgren P, Zohari S, Ben Ali J, Ghram A, Leijon M, Hmila I. 2016.** Accurate detection of avian respiratory viruses by use of multiplex PCR-based luminex suspension microarray Assay. *J Clin Microbiol* 54: 2716-2725.
161. **Lam HY, Yeap SK, Pirozyan MR, Omar AR, Yusoff K, Suraini AA, Abd-Aziz S, Alitheen NB. 2011.** Safety and clinical usage of Newcastle disease virus in cancer therapy. *J Biomed Biotechnol* 2011: 718710.
162. **Lam KM. 2003.** Newcastle disease virus-induced damage to embryonic tracheae and red blood cells. *Avian Dis* 47: 197-202.
163. **Lamb RA, y Kolakovsky D. 1996.** Paramyxoviridae: the viruses and their replication. En: *Fields virology*. 2<sup>da</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. p 1177–1204.
164. **Lamb R, Parks G. 2007.** Paramyxoviridae: the viruses and their replication. En: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, eds. *Fields virology*. 5<sup>ta</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p 957-960.
165. **Lamb R, Paterson RG, Jardetzky TS. 2006.** Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures. *Virology* 344: 30-37.

166. **Lambrecht B, Gonze M, Meulemans G, Van Den Berg TP. 2004.** Assessment of the cell-mediated immune response in chickens by detection of chicken interferon-gamma in response to mitogen and recall Newcastle disease viral antigen stimulation. *Avian Pathol* 33: 343-350.
167. **Lancaster JE. 1966.** Newcastle disease a review, 1926–1964. Ottawa: Departamento de Agricultura de Canada. Series de monografías técnicas. p 167.
168. **Lardinois A, Steensels M, Lambrecht B, Desloges N, Rahaus M, Rebeski D, Van Den Berg T. 2012.** Potency of a recombinant NDV-H5 vaccine against various HPAI H5N1 virus challenges in SPF chickens. *Avian Dis* 56: 928-936.
169. **Le Gros FX, Dancer A, Giacomini C, Pizzoni L, Bublot M, Graziani M, Prandini F. 2009.** Field efficacy trial of a novel HVT-IBD vector vaccine for 1-day-old broilers. *Vaccine* 27: 592-596.
170. **Lemon JK, Khil PP, Frank KM, Dekker JP. 2017.** Rapid nanopore sequencing of plasmids and resistance gene detection in clinical isolates. *J Clin Microbiol* 55: 3530-3543.
171. **Lessard M, Hutchings D, Cave NA. 1997.** Cell-mediated and humoral immune responses in broiler chickens maintained on diets containing different levels of vitamin A. *Poult Sci* 76: 1368-1378.
172. **Li C, Bu Z, Chen H. 2014.** Avian influenza vaccines against H5N1 'bird flu'. *Trends Biotechnol* 32: 147-156.
173. **Li X, Chai T, Wang Z, Song C, Cao H, Liu J, Zhang X, Wang W, Yao M, Miao Z. 2009.** Occurrence and transmission of Newcastle disease virus aerosol originating from infected chickens under experimental conditions. *Vet Microbiol* 136: 226-232.
174. **Li Q, Xue C, Qin J, Zhou Q, Chen F, Bi Y, Cao Y. 2009.** An improved reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and specific detection of Newcastle disease virus. *Arch Virol* 154: 1433-1440.
175. **Liu H, Lu Y, Afonso CL, Ge S, Zheng D, Zhao Y, Wang Z. 2013.** Complete genome sequences of new emerging Newcastle disease virus strains isolated from China. *Genome Announc* 1.
176. **Liu MM, Cheng JL, Yu XH, Qin ZM, Tian FL, Zhang GZ. 2015.** Generation by reverse genetics of an effective attenuated Newcastle disease virus vaccine based on a prevalent highly virulent Chinese strain. *Biotechnol Lett* 37: 1287-1296.

177. **Liu H, Zhang P, Wu P, Chen S, Mu G, Duan X, Hao H, Du E, Wang X, Yang Z. 2013.** Phylogenetic characterization and virulence of two Newcastle disease viruses isolated from wild birds in China. *Infect Genet Evol* 20: 215-224.
178. **Loke CF, Omar AR, Raha AR, Yusoff K. 2005.** Improved protection from velogenic Newcastle disease virus challenge following multiple immunizations with plasmid DNA encoding for F and HN genes. *Vet Immunol Immunopathol* 106: 259-267.
179. **Loo YM, Fornek J, Crochet N, Bajwa G, Perwitasari O, Martinez-Sobrido L, Akira S, Gill MA, Garcia-Sastre A, Katze MG, Gale M Jr. 2008.** Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol* 82: 335-345.
180. **Lu A, Diao Y, Chen H, Wang J, Ge P, Sun X, Hao D. 2014.** Evaluation of histopathological changes, viral load and immune function of domestic geese infected with Newcastle disease virus. *Avian Pathol* 43: 325-332.
181. **Lung O, Beeston A, Ohene-Adjei S, Pasick J, Hodko D, Hughes KB, Furukawa-Stoffer T, Fisher M, Deregt D. 2012.** Electronic microarray assays for avian influenza and Newcastle disease virus. *J Virol Methods* 185: 244-253.
182. **Mayers J, Mansfield KL, Brown IH. 2017.** The role of vaccination in risk mitigation and control of Newcastle disease in poultry. *Vaccine* 35: 5974-5980.
183. **Mazija H, Cajavec S, Ergotic N, Ciglar-Grozdanic I, Gottstein Z, Ragland WL. 2010.** Immunogenicity and safety of Queensland V4 and Ulster 2C strains of Newcastle disease virus given to maternally immune, newly hatched chickens by nebulization. *Avian Dis* 54: 99-103.
184. **McGinnes LW, Pantua H, Laliberte JP, Gravel KA, Jain S, Morrison TG. 2010.** Assembly and biological and immunological properties of Newcastle disease virus-like particles. *J Virol* 84: 4513-4523.
185. **Mebatsion T, Versteegen S, De Vaan LT, Romer-Oberdorfer A, Schrier CC. 2001.** A recombinant Newcastle disease virus with low-level V protein expression is immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos. *J Virol*, 75, 420-428.
186. **Mendoza AP. 2010.** Avian influenza and Newcastle disease viruses in the live bird trade of Peru. En: 59th Annual International Conference of the Wildlife Disease Association.

187. **Metzker ML. 2010.** Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 11: 31-46.
188. **Meulemans G. 1988.** Control by vaccination. En: Alexander DJ, ed. *Newcastle Disease*. Boston, MA: Springer.
189. **Meulemans G, Letellier C, Gonze M, Carlier MC, Burny A. 1988.** Newcastle disease virus F glycoprotein expressed from a recombinant vaccinia virus vector protects chickens against live-virus challenge. *Avian Pathol* 17: 821-827.
190. **Miller PJ, Afonso CL, El Attrache J, Dorsey KM, Courtney SC, Guo Z, Kapczynski DR. 2013.** Effects of Newcastle disease virus vaccine antibodies on the shedding and transmission of challenge viruses. *Dev Comp Immunol* 41: 505-513.
191. **Miller PJ, Decanini EL, Afonso CL. 2010.** Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infect Genet Evol* 10: 26-35.
192. **Miller PJ, Dimitrov KM, Williams-Coplin D, Peterson MP, Pantin-Jackwood MJ, Swayne DE, Suarez DL, Afonso CL. 2015.** International biological engagement programs facilitate Newcastle disease epidemiological studies. *Front Public Health* 3: 235.
193. **Miller PJ, Estevez C, Yu Q, Suarez DL, King DJ. 2009a.** Comparison of viral shedding following vaccination with inactivated and live Newcastle disease vaccines formulated with wild-type and recombinant viruses. *Avian Dis* 53: 39-49.
194. **Miller PJ, Kim LM, Ip HS, Afonso CL. 2009b.** Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus. *Virology* 391: 64-72.
195. **Miller PJ, King DJ, Afonso CL, Suarez DL. 2007.** Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. *Vaccine* 25: 7238-7246.
196. **Miller PJ y Koch G. 2013.** Capítulo: Newcastle Disease. En: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair VL, eds. *Diseases of Poultry*. 13<sup>va</sup> ed. USA: American Association Avian Pathologists. p 90-91.
197. **Miller PJ, Torchetti MK. 2014.** Newcastle disease virus detection and differentiation from avian influenza. En: Spackman E, ed. *Animal Influenza Virus*. New York, NY: Springer New York.

198. **Mohsen MO, Zha L, Cabral-Miranda G, Bachmann MF. 2017.** Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Semin Immunol* 34: 123-132.
199. **Morgan RW, Gelb J Jr, Schreurs CS, Lutticken D, Rosenberger JK, Sondermeijer PJ. 1992.** Protection of chickens from Newcastle and Marek's diseases with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing the Newcastle disease virus fusion protein. *Avian Dis* 36: 858-870.
200. **Mori Y, Notomi T. 2009.** Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother* 15: 62-69.
201. **Morrison TG. 2010.** Newcastle disease virus-like particles as a platform for the development of vaccines for human and agricultural pathogens. *Future Virol* 5: 545-554.
202. **Munir M, Zohari S, Abbas M, Berg M. 2012.** Sequencing and analysis of the complete genome of Newcastle disease virus isolated from a commercial poultry farm in 2010. *Arch Virol* 157: 765-768.
203. **Munir S, Sharma JM, Kapur V. 2005.** Transcriptional response of avian cells to infection with Newcastle disease virus. *Virus Res* 107: 103-108.
204. **Nagai Y, Klenk HD, Rott R. 1976.** Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* 72: 494-508.
205. **Nanthakumar T, Kataria RS, Tiwari AK, Butchaiah G, Kataria JM. 2000.** Pathotyping of Newcastle disease viruses by RT-PCR and restriction enzyme analysis. *Vet Res Commun* 24: 275-286.
206. **Njiru ZK. 2012.** Loop-mediated isothermal amplification technology: towards point of care diagnostics. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1572.
207. **Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000.** Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28: E63.
208. **[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2012.** Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: mammals, birds and bees. París: OIE. Biological standards commission, vol. 1, parte 2, capítulo 2.03.14. 1–19 p.

209. **OIE. 2018.** París: Organización Mundial de Sanidad Animal. [Internet], [12 febrero 2018].  
Disponible en: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2018/>
210. **OIE. 2018.** París: Organización Mundial de Sanidad Animal. [Internet], [29 julio 2018].  
Disponible en: [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasetimelines](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasetimelines)
211. **OIE. 2019.** París: Organización Mundial de Sanidad Animal. [Internet], [22 enero 2019].  
Disponible en: [https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail)
212. **Paldurai A, Kim SH, Nayak B, Xiao S, Shive H, Collins PL, Samal SK. 2014.** Evaluation of the contributions of individual viral genes to Newcastle disease virus virulence and pathogenesis. *J Virol* 88: 8579-8596.
213. **Palomino V, Icochea E, Guzmán J, Sam R, Manchego A. 2011.** Interferencia de la vacunación simultánea contra Metapneumovirus aviar, bronquitis infecciosa y enfermedad de Newcastle en pollos de carne. *Rev Inv Vet Perú*, 22(1): 45-52.
214. **Palya V, Kiss I, Tatar-Kis T, Mato, T, Felföldi B, Gardin Y. 2012.** Advancement in vaccination against Newcastle disease: recombinant HVT NDV provides high clinical protection and reduces challenge virus shedding with the absence of vaccine reactions. *Avian Dis* 56: 282-287.
215. **Palya V, Tatar-Kis T, Mato T, Felföldi B, Kovacs E, Gardin Y. 2014.** Onset and long-term duration of immunity provided by a single vaccination with a turkey herpesvirus vector ND vaccine in commercial layers. *Vet Immunol Immunopathol* 158: 105-115.
216. **Panigrahy B, Senne DA, Pearson JE, Mixson MA, Cassidy DR. 1993.** Occurrence of velogenic viscerotropic Newcastle disease in pet and exotic birds in 1991. *Avian Dis* 37: 254-258.
217. **Pantua HD, McGinnes LW, Peebles ME, Morrison TG. 2006.** Requirements for the assembly and release of Newcastle disease virus-like particles. *J Virol* 80: 11062-11073.
218. **Park JK, Lee DH, Yuk SS, Tseren-Ochir EO, Kwon JH, Noh JY, Kim BY, Choi SW, Kang SM, Lee JB, Park SY, Choi IS, Song CS. 2014.** Virus-like particle vaccine confers protection against a lethal Newcastle disease virus challenge in chickens and allows a strategy of differentiating infected from vaccinated animals. *Clin Vaccine Immunol* 21: 360-365.

219. **Park MS, Garcia-Sastre A, Cros JF, Basler CF, Palese P. 2003a.** Newcastle disease virus V protein is a determinant of host range restriction. *J Virol* 77: 9522-9532.
220. **Park MS, Shaw ML, Munoz-Jordan J, Cros JF, Nakaya T, Bouvier N, Palese P, Garcia-Sastre A, Basler CF. 2003b.** Newcastle disease virus (NDV)-based assay demonstrates interferon-antagonist activity for the NDV V protein and the Nipah virus V, W, and C proteins. *J Virol* 77: 1501-1511.
221. **Pearson JE, Senne DA, Alexander DJ, Taylor WD, Peterson LA, Russell PH. 1987.** Characterization of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus-1) isolated from pigeons. *Avian Dis* 31: 105-111.
222. **Pedersen K, Marks DR, Afonso CL, Stopak SR, Williams-Coplin D, Dimitrov KM, Miller PJ, DeLiberto TJ. 2016.** Identification of avian paramyxovirus serotype-1 in wild birds in the USA. *J Wildl Dis* 52: 657-662.
223. **Peeters BP, De Leeuw OS, Koch G, Gielkens AL. 1999.** Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J Virol* 73: 5001-5009.
224. **Peeters BP, Gruijthuisen YK, De Leeuw OS, Gielkens AL. 2000.** Genome replication of Newcastle disease virus: involvement of the rule-of-six. *Arch Virol* 145: 1829-1845.
225. **Perozo F, Villegas P, Dolz R, Afonso CL, Purvis LB. 2008.** The VG/GA strain of Newcastle disease virus: mucosal immunity, protection against lethal challenge and molecular analysis. *Avian Pathol* 37: 237-245.
226. **Pfaller CK, Cattaneo R, Schnell MJ. 2015a.** Reverse genetics of Mononegavirales: how they work, new vaccines, and new cancer therapeutics. *Virology* 479-480: 331-344.
227. **Pfaller CK, Mastorakos GM, Matchett WE, Ma X, Samuel CE, Cattaneo R. 2015b.** Measles virus defective interfering RNAs are generated frequently and early in the absence of C protein and can be destabilized by adenosine deaminase acting on RNA-1-like hypermutations. *J Virol* 89: 7735-7747.
228. **Pham HM, Nakajima C, Ohashi K, Onuma M. 2005.** Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Newcastle disease virus. *J Clin Microbiol* 43: 1646-1650.

229. **Phan HT, Stoesser N, Maciucă IE, Toma F, Szekely E, Flonta M, Hubbard AT, Pankhurst L, Do T, Peto TE, Walker AS, Crook DW, Timofte D. 2017.** Illumina short-read and MinION long-read WGS to characterize the molecular epidemiology of an NDM-1 *Serratia marcescens* outbreak in Romania. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73: 672-679.
230. **Philipps L, Navaes O, Fernández L. 1951.** La neumoencefalitis aviar en el Perú. *Rev Inst Nac Biol Animal* 2: 31-51.
231. **Poch O, Blumberg BM, Bougueleret L, Tordo N. 1990.** Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol* 71 Pt 5: 1153-1162.
232. **Qiu X, Yu Y, Yu S, Zhan Y, Wei N, Song C, Sun Y, Tan L, Ding C. 2014.** Development of strand-specific real-time RT-PCR to distinguish viral RNAs during Newcastle disease virus infection. *ScientificWorldJournal* 2014: 934851.
233. **Quevedo T, Icochea E, Alba M, Sandoval N, Rosadio R. 2009.** Estudio clínico, serológico y patológico de una cepa velogénica del virus de Newcastle en codornices (*Coturnix coturnix japonica*). *Rev Inv Vet Perú*, 20 (1): 66-71.
234. **Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, Oliveira G, Robles-Sikisaka R, Rogers TF, Beutler NA, Burton DR, Lewis-Ximenez LL, De Jesus JG, Giovanetti M, Hill SC, Black A, Bedford T, Carroll MW, Nunes M, Alcantara LC Jr, Sabino EC, Baylis SA, Faria NR, Loose M, Simpson JT, Pybus OG, Andersen KG, Loman NJ. 2017.** Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat Protoc* 12: 1261-1276.
235. **Quick J, Loman NJ, Duraffour S, Simpson JT, Severi E, Cowley L, Bore JA, Koundouno R, Dudas G, Mikhail A, Ouedraogo N, Afrough B, Bah A, Baum JH, Becker-Ziaja B, Boettcher JP, Cabeza-Cabrero M, Camino-Sanchez A, Carter LL, Doerrbecker J, Enkirch T, Dorival IG, Hetzelt N, Hinzmann J, Holm T, Kafetzopoulou LE, Koropogui M, Kosgey A, Kuisma E, Logue CH, Mazzei A, Meisel S, Mertens M, Michel J, Ngabo D, Nitzsche K, Pallash E, Patrono LV, Portmann J, Repits JG, Rickett NY, Sachse A, Singethan K, Vitoriano I, Yemanaberhan RL, Zekeng EG, Trina R, Bello A, Sall AA, Faye O, Magassouba N, Williams CV, Amburgey V,**



- Winona L, Davis E, Gerlach J, Washington F, Monteil V, Jourdain M, Bererd M, Camara A, Somlare H, Camara A, Gerard M, Bado G, Baillet B, Delaune D, Nebie KY, Diarra A, Savane Y, Pallawo RB, Gutierrez GJ, Milhano N, Roger I, Williams CJ, Yattara F, Lewandowski K, Taylor J, Rachwal P, Turner D, Pollakis G, Hiscox JA, Matthews DA, O'Shea MK, Johnston AM, Wilson D, Hutley E, Smit E, Di Caro A, Woelfel R, Stoecker K, Fleischmann E, Gabriel M, Weller SA, Koivogui L, Diallo B, Keita S, Rambaut A, Formenty P, Gunther S, Carroll MW. 2016.* Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature* 530: 228-232.
236. *Rahman AU, Habib M, Shabbir MZ. 2018.* Adaptation of Newcastle disease virus (NDV) in feral birds and their potential role in interspecies transmission. *Open Virol J* 12: 52-68.
237. *Rangaswamy US, Wang W, Cheng X, McTamney P, Carroll D, Jin H. 2017.* Newcastle disease virus establishes persistent infection in tumor cells in vitro: Contribution of the cleavage site of fusion protein and second sialic acid binding site of hemagglutinin-neuraminidase. *J Virol* 91.
238. *Rautenschlein S, Kraemer C, Montiel E, Vanmarcke J, Haase C. 2007.* Bilateral effects of vaccination against infectious bursal disease and Newcastle disease in specific-pathogen-free layers and commercial broiler chickens. *Avian Dis* 51: 14-20.
239. *Rauw F, Gardin Y, Palya V, Van Borm S, Gonze M, Lemaire S, Van Den Berg T, Lambrecht B. 2009.* Humoral, cell-mediated and mucosal immunity induced by oculo-nasal vaccination of one-day-old SPF and conventional layer chicks with two different live Newcastle disease vaccines. *Vaccine* 27: 3631-3642.
240. *Rauw F, Van Borm S, Welby S, Ngabirano E, Gardin Y, Palya V, Lambrecht B. 2015.* Quantification of rHVT-F genome load in feather follicles by specific real-time qPCR as an indicator of NDV-specific humoral immunity induced by day-old vaccination in SPF chickens. *Avian Pathol* 44: 154-161.
241. *Ravina P. 2005.* Monitoreo serológico de la enfermedad de Newcastle efectuado en aves domésticas (*Gallus gallus*) en Ica, Arequipa, Moquegua, Tacna, Junín, Huancavelica, Ayacucho, Cuzco, Apurímac, Puno - 2001. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 29 p.

242. **Reddy GS, Srinivasan VA. 1991.** Comparison of two experimental binary ethylenimine (BEI) inactivated Newcastle disease oil-emulsion vaccines. *Acta Virol* 35: 196-199.
243. **Rehman ZU, Meng C, Sun Y, Mahrose KM, Umar S, Ding C, Munir M. 2018.** Pathobiology of avian avulavirus 1: special focus on waterfowl. *Vet Res* 49: 94.
244. **Reynolds DL, Maraqa AD. 2000a.** Protective immunity against Newcastle disease: the role of antibodies specific to Newcastle disease virus polypeptides. *Avian Dis* 44: 138-144.
245. **Reynolds DL, Maraqa AD. 2000b.** Protective immunity against Newcastle disease: the role of cell-mediated immunity. *Avian Dis* 44: 145-154.
246. **Rojas H, Romero JR. 2017.** Where to next with animal health in Latin America? the transition from endemic to disease-free status. *Rev Sci Tech* 36: 331-348.
247. **Romer-Oberdorfer A, Werner O, Veits J, Mebatsion T, Mettenleiter TC. 2003.** Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity. *J Gen Virol* 84: 3121-3129.
248. **Rout SN, Samal SK. 2008.** The large polymerase protein is associated with the virulence of Newcastle disease virus. *J Virol* 82: 7828-7836.
249. **Roy P, Venugopalan AT. 2005.** Unexpected Newcastle disease virus in day old commercial chicks and breeder hen. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 28: 277-285.
250. **Rue CA, Susta L, Cornax I, Brown CC, Kapczynski DR, Suarez DL, King DJ, Miller PJ, Afonso CL. 2011.** Virulent Newcastle disease virus elicits a strong innate immune response in chickens. *J Gen Virol*, 92, 931-939.
251. **Russell PH, Alexander DJ. 1983.** Antigenic variation of Newcastle disease virus strains detected by monoclonal antibodies. *Arch Virol* 75: 243-253.
252. **Russell PH, Ezeifeka GO. 1995.** The Hitchner B1 strain of Newcastle disease virus induces high levels of IgA, IgG and IgM in newly hatched chicks. *Vaccine* 13: 61-66.
253. **Sa ES, Susta L, Moresco K, Swayne DE. 2016.** Vaccination of chickens decreased Newcastle disease virus contamination in eggs. *Avian Pathol* 45: 38-45.

254. **Sadigh-Eteghad S, Khalili I, Babaei H, Toroghi R, Razmaraii N, Froggy L. 2012.** Immunogenicity of commercial, formaldehyde and binary ethylenimine inactivated Newcastle disease virus vaccines in specific pathogen free chickens. Archives of Razi Institute 67: 21-25.
255. **Sang S, Wang Y, Feng Q, Wei Y, Ji J, Zhang W. 2016.** Progress of new label-free techniques for biosensors: a review. Crit Rev Biotechnol 36: 465-481.
256. **Sawant PM, Verma PC, Subudhi PK, Chaturvedi U, Singh M, Kumar R, Tiwari AK. 2011.** Immunomodulation of bivalent Newcastle disease DNA vaccine induced immune response by co-delivery of chicken IFN-gamma and IL-4 genes. Vet Immunol Immunopathol 144: 36-44.
257. **Sayantan B, Zokarkar A, Welch B, Leser GP, Jardetzky TS, Lamb RA. 2012.** Fusion activation by a headless parainfluenza virus 5 hemagglutinin-neuraminidase stalk suggests a modular mechanism for triggering. Proceedings of the National Academy of Sciences 109 39: 15549-15550.
258. **Schijns VE, Zande S, Lupiani B, Reddy SM. 2013.** Practical aspects of poultry vaccination. En: Schat KA, Kaspers B, Kaiser P, eds. Avian immunology. 2<sup>do</sup> ed. USA: Academic Press. p 345 – 362.
259. **Schirmacher V, Fournier P. 2009.** Newcastle disease virus: a promising vector for viral therapy, immune therapy, and gene therapy of cancer. Methods Mol Biol 542: 565-605.
260. **Schirmacher V, Griesbach A, Ahlert T. 2001.** Antitumor effects of Newcastle disease virus in vivo: local versus systemic effects. Int J Oncol 18: 945-952.
261. **Schwarz H, Harlin O, Ohnemus A, Kaspers B, Staeheli P. 2004.** Synthesis of IFN-beta by virus-infected chicken embryo cells demonstrated with specific antisera and a new bioassay. J Interferon Cytokine Res 24: 179-184.
262. **SENASA 2003.** Lima. Servicio Nacional de Sanidad Agraria. Reglamento de control y erradicación de la enfermedad de Newcastle. Lima: SENASA. [Internet], [10 de noviembre 2019]. Disponible en: [https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/jer/SAN\\_AVI/1177.pdf](https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/jer/SAN_AVI/1177.pdf)
263. **SENASA. 2019a.** Lima: Servicio Nacional de Sanidad Agraria. [Internet], [15 de noviembre 2019]. Disponible en: <http://www.senasa.gob.pe/senasacontigo/vacunar-a-mas-de-388-mil-aves-para-prevenir-la-enfermedad-de-newcastle-en-la-libertad/>

264. **[SENASA] Servicio Nacional de Sanidad Agraria. 2019b.** Plan zonal de erradicación de la enfermedad de Newcastle y control de la inocuidad de productos agrícolas. Lima: SENASA. Informe técnico. 6p.
265. **Senne DA, King DJ, Kapczynski DR. 2004.** Control of Newcastle disease by vaccination. *Dev Biol (Basel)* 119: 165-170.
266. **Senthuran S, Vijayarani K, Kumanan K, Nainar AM. 2005.** Pathotyping of Newcastle disease virus isolates from pet birds. *Acta Virol* 49: 177-182.
267. **Sharma JM. 1999.** Introduction to poultry vaccines and immunity. *Adv Vet Med* 41: 481-494.
268. **Shi SH, Huang Y, Cui SJ, Cheng LF, Fu GH, Li X, Chen Z, Peng CX, Lin F, Lin JS, Su JL. 2011.** Genomic sequence of an avian paramyxovirus type 1 strain isolated from Muscovy duck (*Cairina moschata*) in China. *Arch Virol* 156: 405-412.
269. **Shobana R, Samal SK, Elankumaran S. 2013.** Prostate-specific antigen-retargeted recombinant Newcastle disease virus for prostate cancer virotherapy. *J Virol* 87: 3792-3800.
270. **Sin ML, Mach KE, Wong PK, Liao JC. 2014.** Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases. *Expert Rev Mol Diagn* 14: 225-244.
271. **Snoeck CJ, Owoade AA, Couacy-Hymann E, Alkali BR, Okwen MP, Adeyanju AT, Komoyo GF, Nakoune E, Le Faou A, Muller CP. 2013.** High genetic diversity of Newcastle disease virus in poultry in West and Central Africa: cocirculation of genotype XIV and newly defined genotypes XVII and XVIII. *J Clin Microbiol* 51: 2250-2260.
272. **Snyder DB, Marquardt WW, Mallinson ET, Savage PK, Allen DC. 1984.** Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. III. Simultaneous measurements of antibody titers to infectious bronchitis, infectious bursal disease, and Newcastle disease viruses in a single serum dilution. *Avian Dis* 28: 12-24.
273. **Sonoda K, Sakaguchi M, Okamura H, Yokogawa K, Tokunaga E, Tokiyoshi S, Kawaguchi Y, Hirai K. 2000.** Development of an effective polyvalent vaccine against both Marek's and Newcastle diseases based on recombinant Marek's disease virus type 1 in commercial chickens with maternal antibodies. *J Virol* 74: 3217-3226.

274. **Souf S. 2016.** Recent advances in diagnostic testing for viral infections. Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research 9.
275. **Spickler AR. 2008.** Newcastle Disease. The Center for Food Security and Public Health, Iowa State University; Institute for International Cooperation in Animal Biologics, Iowa State University [Internet], [11 febrero 2019]. Disponible en: [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/newcastle\\_disease-es.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/newcastle_disease-es.pdf)
276. **Steward M, Samson AC, Errington W, Emmerson PT. 1995.** The Newcastle disease virus V protein binds zinc. Arch Virol 140: 1321-1328.
277. **Steward M, Vipond IB, Millar NS, Emmerson PT. 1993.** RNA editing in Newcastle disease virus. J Gen Virol 74 (pt 12): 2539-2547.
278. **Stojdl DF, Lichty B, Knowles S, Marius R, Atkins H, Sonenberg N, Bell JC. 2000.** Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. Nat Med 6: 821-825.
279. **Stojdl DF, Lichty BD, TenOever BR, Paterson JM, Power AT, Knowles S, Marius R, Reynard J, Poliquin L, Atkins H, Brown EG, Durbin RK, Durbin JE, Hiscott J, Bell JC. 2003.** VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. Cancer Cell 4: 263-275.
280. **Sultankulova KT, Kozhabergenov NS, Storchkov VM, Burashev YD, Shorayeva KA, Chervyakova OV, Rametov NM, Sandybayev NT, Sansyzbay AR, Orynbayev MB. 2017.** New oligonucleotide microarray for rapid diagnosis of avian viral diseases. Virol J 14: 69.
281. **Sun Y, Ding N, Ding SS, Yu S, Meng C, Chen H, Qiu X, Zhang S, Yu Y, Zhan Y, Ding C. 2013.** Goose RIG-I functions in innate immunity against Newcastle disease virus infections. Mol Immunol 53: 321-327.
282. **Susta L, Jones ME, Cattoli G, Cardenas-Garcia S, Miller PJ, Brown CC, Afonso CL. 2015.** Pathologic characterization of genotypes XIV and XVII Newcastle disease viruses and efficacy of classical vaccination on specific pathogen-free birds. Vet Pathol 52: 120-131.

283. **Susta L, Miller PJ, Afonso CL, Brown CC. 2011.** Clinicopathological characterization in poultry of three strains of Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks. *Vet Pathol* 48: 349-360.
284. **Taylor J, Christensen L, Gettig R, Goebel J, Bouquet JF, Mickle TR, Paoletti E. 1996.** Efficacy of a recombinant fowl pox-based Newcastle disease virus vaccine candidate against velogenic and respiratory challenge. *Avian Dis* 40: 173-180.
285. **Taylor J, Edbauer C, Rey-Senelongue A, Bouquet JF, Norton E, Goebe S, Desmettre P, Paoletti E. 1990.** Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowlpox virus recombinant confers protection in chickens. *J Virol* 64: 1441-1450.
286. **Terregino C, Cattoli G, Grossele B, Bertoli E, Tisato E, Capua I. 2003.** Characterization of Newcastle disease virus isolates obtained from Eurasian collared doves (*Streptopelia decaocto*) in Italy. *Avian Pathol* 32: 63-68.
287. **Terregino C, Capua I. 2009.** Conventional diagnosis of Newcastle disease virus infection. En: Capua I, Alexander DJ, eds. *Avian Influenza and Newcastle Disease*. USA: Springer. p. 123–125.
288. **Thayer SG, Villegas P, Fletcher OJ. 1987.** Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays and conventional methods for avian serology. *Avian Dis* 31: 120-124.
289. **Thomazelli LM, De Araujo J, Fabrizio T, Walker D, Reischak D, Ometto T, Barbosa CM, Petry MV, Webby RJ, Durigon EL. 2017.** Novel avian paramyxovirus (APMV-15) isolated from a migratory bird in South America. *PLoS One* 12: e0177214.
290. **Thornton DH, Hopkins IG, Hebert CN. 1980.** Potency of live Newcastle disease vaccines. *Avian Pathol* 9: 457-464.
291. **Timms L, Alexander D.J. 1977.** Cell-mediated immune response of chickens to Newcastle disease vaccines. *Avian Pathol* 6: 51-59.
292. **Tlaxca JL, Ellis S, Remmele RL Jr. 2015.** Live attenuated and inactivated viral vaccine formulation and nasal delivery: potential and challenges. *Adv Drug Deliv Rev* 93: 56-78.
293. **Umino Y, Kohama T, Kohase M, Sugiura A, Klenk HD, Rott R. 1987.** Protective effect of antibodies to two viral envelope glycoproteins on lethal infection with Newcastle disease virus. *Arch Virol* 94: 97-107.

294. **Van Boven M, Bouma A, Fabri TH, Katsma E, Hartog L, Koch G. 2008.** Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. *Avian Pathol* 37: 1-5.
295. **Vargas J, Alba M, Icochea E, Sandoval N, Manchego A. 2004.** Patogenicidad y respuesta serológica de las tórtolas (*Eupelia cruziana*) frente a un desafío experimental con un virus de la enfermedad de Newcastle. *Rev Inv Vet Perú*, 15 (1): 76-82.
296. **Ventocilla K, Icochea E, Gonzales R, González A. 2011.** Presencia del virus de la enfermedad de Newcastle en aves silvestres de una laguna albufera cercana a Lima. *RIVEP* 22:1, 39-44.
297. **Vidal S, Kolakofsky D. 1989.** Modified model for the switch from Sendai virus transcription to replication. *J Virol* 63: 1951-1958.
298. **Villarreal C. 2009.** Avian influenza in Mexico. *Rev Sci Tech* 28: 261-265.
299. **Wakamatsu N, King DJ, Kapczynski DR, Seal BS, Brown CC. 2006a.** Experimental pathogenesis for chickens, turkeys, and pigeons of exotic Newcastle disease virus from an outbreak in California during 2002-2003. *Vet Pathol* 43: 925-933.
300. **Wakamatsu N, King DJ, Seal BS, Peeters BP, Brown CC. 2006b.** The effect on pathogenesis of Newcastle disease virus LaSota strain from a mutation of the fusion cleavage site to a virulent sequence. *Avian Dis* 50: 483-488.
301. **Wakamatsu N, King DJ, Seal BS, Samal SK, Brown CC. 2006c.** The pathogenesis of Newcastle disease: a comparison of selected Newcastle disease virus wild-type strains and their infectious clones. *Virology* 353: 333-343.
302. **Wang J, Moore NE, Deng YM, Eccles DA, Hall RJ. 2015.** MinION nanopore sequencing of an influenza genome. *Front Microbiol* 6: 766.
303. **Wang LC, Pan CH, Severinghaus LL, Liu LY, Chen CT, Pu, CE, Huang D, Lir JT, Chin SC, Cheng MC, Lee SH, Wang CH. 2008.** Simultaneous detection and differentiation of Newcastle disease and avian influenza viruses using oligonucleotide microarrays. *Vet Microbiol* 127: 217-226.
304. **Wang Z, Vreede FT, Mitchell JO, Viljoen GJ. 2001.** Rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus isolates by a triple one-step RT-PCR. *Onderstepoort J Vet Res* 68 131-134.

305. **Wernery U, Remple JD, Neumann U, Alexander DJ, Manvell RJ, Kaaden OR. 1992.** Avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus)--infections in falcons. *Zentralbl Veterinarmed B* 39: 153-158.
306. **Wernery U. 2016.** Chapter 14: Infectious Diseases. En: Samour J. ed. *Avian Medicine*. 3<sup>rd</sup> ed. USA: Elsevier Ltd. p 440-442.
307. **Westbury HA, Parsons G, Allan WH. 1984.** Comparison of the immunogenicity of Newcastle disease virus strains V4, Hitchner B1 and La Sota in chickens. 2. Tests in chickens with maternal antibody to the virus. *Aust Vet J* 61: 10-13.
308. **Wilden H, Fournier P, Zawatzky R, Schirmacher V. 2009.** Expression of RIG-I, IRF3, IFN-beta and IRF7 determines resistance or susceptibility of cells to infection by Newcastle Disease Virus. *Int J Oncol* 34: 971-982.
309. **Winterfield RW, Dhillon AS. 1981.** Comparative immune response from vaccinating chickens with lentogenic Newcastle disease virus strains. *Poult Sci* 60: 1195-1203.
310. **Winterfield RW, Dhillon AS, Alby LJ. 1980.** Vaccination of chickens against Newcastle disease with live and inactivated Newcastle disease virus. *Poult Sci* 59: 240-246.
311. **Wu W, Liu H, Zhang T, Han Z, Jiang Y, Xu Q, Shao Y, Li H, Kong X, Chen H, Liu S. 2015.** Molecular and antigenic characteristics of Newcastle disease virus isolates from domestic ducks in China. *Infect Genet Evol* 32: 34-43.
312. **Xiao S, Nayak B, Samuel A, Paldurai A, Kanabagattebasavarajappa M, Prajitno TY, Bharoto EE, Collins PL, Samal SK. 2012.** Generation by reverse genetics of an effective, stable, live-attenuated Newcastle disease virus vaccine based on a currently circulating, highly virulent Indonesian strain. *PLoS One* 7: e52751.
313. **Yang HM, Zhao J, Xue J, Yang YL, Zhang GZ. 2017.** Antigenic variation of LaSota and genotype VII Newcastle disease virus (NDV) and their efficacy against challenge with velogenic NDV. *Vaccine* 35: 27-32.
314. **Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. 2004.** The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5: 730-737.



315. **Yuan P, Swanson KA, Leser GP, Paterson RG, Lamb RA, Jardetzky TS. 2011.** Structure of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase (HN) ectodomain reveals a four-helix bundle stalk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 14920-14925.
316. **Zhai L, Li Y, Wang W, Hu S. 2011.** Enhancement of humoral immune responses to inactivated Newcastle disease and avian influenza vaccines by oral administration of ginseng stem-and-leaf saponins in chickens. *Poult Sci* 90: 1955-1959.
317. **Zhao K, Han J, Zhang Y, Wei L, Yu S, Wang X, Jin Z, Wang Y. 2018.** Enhancing mucosal immune response of Newcastle disease virus DNA vaccine using N-2-hydroxypropyl trimethylammonium chloride chitosan and N, O-carboxymethyl chitosan nanoparticles as delivery carrier. *Mol Pharm* 15: 226-237.
318. **Zhao K, Zhang Y, Zhang X, Li W, Shi C, Guo C, Dai C, Chen Q, Jin Z, Zhao Y, Cui H, Wang Y. 2014.** Preparation and efficacy of Newcastle disease virus DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 9: 389-402.
319. **Zhong Z, Ji Y, Fu Y, Liu B, Zhu Q. 2015.** Molecular characterization and expression analysis of the duck viperin gene. *Gene* 570: 100-107.